

IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS EN
SEMILLAS TOSTADAS DE CACAO VARIEDAD CRIOLLO (*Theobroma*
bovalifolium) CULTIVADAS EN LA ASOCIACIÓN CORTE PAZ DEL MUNICIPIO
DE TUMACO.

EDNA JAZMIN OTERO ROJAS
Estudiante del programa de Química

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO

2017

IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS EN
SEMILLAS TOSTADAS DE CACAO VARIEDAD CRIOLLO (*Theobroma*
bovalifolium) CULTIVADAS EN LA ASOCIACIÓN CORTE PAZ DEL MUNICIPIO
DE TUMACO.

EDNA JAZMIN OTERO ROJAS

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Director
OLGA LUCIA BENAVIDES CALVACHE
Ing. Química, M. Sc.

Codirector
JUAN PABLO JIMENEZ MORA
Químico

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO

2017

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1° del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

OLGA LUCIA BENAVIDES CALVACHE

Director

JUAN PABLO JIMNEZ MORA

Co-Director

JUAN JOSE LOZADA CASTRO

Jurado

JESÚS ADRIANO ROMO

Jurado

San Juan de Pasto, 9 de marzo de 2017

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Jaro Otero y Nancy Rojas quienes han sido los pilares de mi vida, quienes con su amor y ejemplo han hecho de mí una persona responsable que con su apoyo he logrado culminar este sueño, ser una profesional.

A mi hijo Samuel que es lo más grande que me ha dado la vida, que ha sido el motor para superarme y cumplir mis sueños para hacer posibles los de él.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas, por su infinito amor, confianza y apoyo.

A mi hijo hermoso por ser la motivación más grande para culminar este proyecto.

A mi amor Juan Pablo, por acompañarme en este camino, en el profesional por compartir sus conocimientos y capacidades para el desarrollo de éste trabajo y el de la vida por ser un apoyo incondicional.

A David Arturo Perdomo, por su colaboración en el análisis estadístico y su orientación durante el desarrollo de este trabajo.

A la docente Olga Lucia Benavides, por la dirección y orientación en éste trabajo.

A la asociación CORTEPAZ por la colaboración en el suministro de las muestras de análisis.

A los profesores del Departamento de Química de la Universidad de Nariño por el aprendizaje adquirido a través de ellos durante la carrera.

A mis compañeros de Química, por su valiosa amistad y por todos los momentos compartidos.

A todos ellos, gracias...

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|---|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 22 |
| 1. OBJETIVOS | 24 |
| 1.1 Objetivo general | 24 |
| 1.2 Objetivos específicos | 24 |
| 2. ESTADO DEL ARTE | 25 |
| 2.1 Antecedentes | 25 |
| 2.2 Marco teórico | 29 |
| 2.2.1 El cacao | 29 |
| 2.2.2 Factores que afectan la calidad del aroma en el grano de cacao | 32 |
| 2.2.2.1 Fermentación del cacao | 33 |
| 2.2.2.2 Secado del cacao | 37 |
| 2.2.2.3 Tostado del cacao | 40 |
| 2.2.3 Métodos de extracción | 55 |
| 2.2.3.1 Micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) | 55 |
| 2.2.4 Técnicas instrumentales de análisis | 58 |
| 2.2.4.1 Cromatografía de gases (GC) | 58 |
| 2.2.4.2 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS) | 59 |
| 3. METODOLOGÍA | 61 |
| 3.1 Plan experimental | 61 |
| 3.1.1 Materia prima | 61 |
| 3.2 Material general de laboratorio | 63 |
| 3.3 Métodos de análisis | 63 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.3.1 | Ajuste de las variables de extracción de los compuestos volátiles | 63 |
| 3.3.2 | Separación e identificación de los compuestos volátiles mayoritarios | 65 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSION | 67 |
| 4.1 | Determinación de las condiciones óptimas de extracción de compuestos volátiles mayoritarios con la muestra de cacao CCN 51 | 67 |
| 4.2 | Identificación de los COVs mayoritarios en el cacao tostado y molido (Licor) por GC-MS | 74 |
| 4.2.1 | Identificación de COVs del cacao CCN51 | 75 |
| 4.2.2 | Identificación de COVs del cacao regional fermentado 5 días (R-5) | 77 |
| 4.2.3 | Identificación de COVs del cacao regional fermentado 6 días (R-6) y las notas odoríficas producidas | 80 |
| 4.3 | Precisión del método Cromatográfico | 82 |
| 4.4 | Comparación de los perfiles aromáticos de los cacaos regionales (R-5 y R-6) | 85 |
| 4.5 | Comparación de los COVs entre las dos variedades de cacao (CCN51 y regional) | 90 |
| 4.5.1 | Análisis de los COVs identificados por familia orgánica | 91 |
| 4.5.2 | Determinación de diferencias significativas entre las muestras | 95 |
| 4.6 | Principales compuestos comunes y mayoritarios responsables del aroma en las diferentes muestras de cacao | 97 |
| 4.7 | Fragmentaciones de algunos COVs | 101 |
| | CONCLUSIONES | 107 |
| | RECOMENDACIONES | 108 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 109 |
| | ANEXOS | 117 |

LISTA DE DIAGRAMAS

| | Pág. |
|---|------|
| Diagrama 1. Factores que afectan el aroma del cacao durante las diferentes etapas del procesamiento | 33 |
| Diagrama 2. Vía general de la reacción de Maillard | 41 |
| Diagrama 3. Etapas de la reacción de Maillard | 42 |
| Diagrama 4. Etapas experimentales | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Dispositivo de Microextracción en fase sólida (SPME) | 55 |
| Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de gases | 58 |
| Figura 3. Espectro de masas y fragmentaciones del benzaldehído | 102 |
| Figura 4. Espectro de masas y fragmentaciones de la 3-hidroxi-2-butanona | 102 |
| Figura 5. Espectro de masas y fragmentaciones del 2,3-butanediol | 104 |
| Figura 6. Espectro de masas y fragmentaciones del caprilato de etilo | 105 |
| Figura 7. Espectro de masas y fragmentaciones de la trimetil pirazina | 106 |

LISTA DE IMAGENES

| | Pág. |
|---|------|
| Imagen 1. Árbol y frutos del cacao | 29 |
| Imagen 2. Variedades de cacao. a) Criollo, b) Forastero, c) trinitario | 31 |
| Imagen 3. Cacao CCN51 | 32 |
| Imagen 4. Proceso de fermentación en la semilla de cacao | 35 |
| Imagen 5. Reacción general de fermentación | 36 |
| Imagen 6. Reacción general de pardeamiento enzimático | 38 |
| Imagen 7. Reacciones de conversión de monofenoles a o-quinonas | 38 |
| Imagen 8. Hidroxilación de quinonas a trihidroxibencenos | 38 |
| Imagen 9. Producción de hidroxiquinonas | 39 |
| Imagen 10. Estructura de polímero formado en el pardeamiento enzimático | 39 |
| Imagen 11. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas | 59 |
| Imagen 12. Localización del municipio de Tumaco en el departamento de Nariño | 62 |
| Imagen 13. Montaje de la técnica Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) | 64 |
| Imagen 14. Cromatógrafo de gases | 65 |
| Imagen 15. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas | 66 |
| Imagen 16. Cromatograma del cacao CCN51 en las condiciones óptimas de extracción | 74 |
| Imagen 17. Cromatograma del cacao CCN51, por HS-SPME y GC-MS | 75 |
| Imagen 18. Cromatograma del cacao regional R-5, por HS-SPME y GC-MS | 78 |
| Imagen 19. Cromatograma del cacao regional R-6, por HS-SPME y GC-MS | 80 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | Pág. |
|--|------|
| Gráfica 1. Diagrama de Pareto para la Extracción de COVs 100 | 69 |
| Gráfica 2. Factores principales de la extracción de COVs 100 | 70 |
| Gráfica 3. Superficie de respuesta estimada para la extracción de COVs | 73 |
| Gráfica 4. Gráfico de medias de área respecto a cada compuesto, por el método de LSD | 88 |
| Gráfica 5. Variación de los COVs para la técnica de extracción HS-SPME en las muestras de cacao | 89 |
| Gráfica 6. Comportamiento de los COVs en las muestras de cacao regional extraídos por HS-SPME y analizadas por GC-MS | 90 |
| Grafica 7a. Evolución por grupo funcional del número de compuestos | 91 |
| Grafica 7b. Área generada por los compuestos volátiles identificados por GC-MS | 92 |
| Gráfica 8. Gráfico de medias de área por cada familia orgánica, por el método de LSD | 97 |
| Gráfica 9. Gráfico de medias de área por cada compuesto mayoritario, por el método de LSD | 100 |
| Gráfica 10. Perfiles Organolépticos de las tres Muestras de Cacao | 101 |

LISTA DE REACCIONES

| | Pág. |
|--|------|
| Reacción A. Condensación azúcar-amina. Formación de las N- glicosilaminas sustituidas. | 43 |
| Reacción B. Reordenamiento de Amadori para la obtención de las 1-amino- 2-desoxi-2-cetosas N-sustituidas | 43 |
| Reacción C. Deshidratación de azúcares. Reacciones de Maillard, rutas principales de formación de melanoidinas a partir de los compuestos de Amadori | 45 |
| Reacción D. Fragmentación de azúcares | 46 |
| Reacción D ₁ . Productos de reacción de la 1-desoxi-2,3-dicetosa | 47 |
| Reacción D ₂ . Productos de reacción de la diacetilformoina | 48 |
| Reacción D ₃ . Obtención de aldehídos | 49 |
| Reacción E. Degradación de Strecker | 49 |
| Reacción F. Condensación aldólica. Formación de quinonas a partir de productos de fragmentación de los azúcares | 50 |
| Reacción G. Condensación aldehído-amina. Formación de compuestos heterocíclicos nitrogenados | 51 |
| Reacción H. Reacciones por radicales libres | 44 |
| Reacción I. Formación del furfural y el pirrol-2-carbaldehído N-sustituido | 53 |
| Reacción J. Formación de pirazinas a partir de derivados 1,2-aminocarbonílicos obtenidos en la degradación de Strecker | 53 |
| Reacción K. Formación de la etilpirazina | 53 |
| Reacción L. Formación de la 2-acetilpirazina a partir del glioxal | 53 |
| Reacción M. Formación de la tetrametil pirazina | 54 |
| Reacción N. Formación de la trimetil pirazina | 54 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Especificaciones de extracción técnica HS-SPME | 64 |
| Tabla 2. Efectos estimados en la extracción 100 COVs | 68 |
| Tabla 3. Análisis de varianza para la extracción de COVs 100 | 69 |
| Tabla 4. Coeficientes de regresión para COVs 100 | 71 |
| Tabla 5. Deseabilidad global óptima para extracción de COVs para SPME | 72 |
| Tabla 6. Condiciones óptimas de extracción de COVs por la técnica HS-SPME | 73 |
| Tabla 7. Clases de cacao estudiadas | 74 |
| Tabla 8. COVs identificados del cacao CCN51 y las notas odoríficas producidas | 76 |
| Tabla 9. COVs identificados del cacao regional fermentado 5 días (R-5) y las notas odoríficas producidas | 79 |
| Tabla 10. COVs identificados del cacao regional fermentado 6 días (R-6) y Las notas odoríficas producidas | 81 |
| Tabla 11. Resultados de la repetibilidad del método | 83 |
| Tabla 12. Resultados de la reproducibilidad del método | 84 |
| Tabla 13. Compuestos comunes de las dos variedades de cacao regional R-5 y R-6 | 85 |
| Tabla 14. Anova para área por compuesto | 86 |
| Tabla 15. Prueba de múltiples rangos para área por compuesto | 87 |
| Tabla 16. Anova para área por familia orgánica | 95 |
| Tabla 17. Pruebas de Múltiple Rangos para áreas por familias orgánicas | 96 |
| Tabla 18. Compuestos mayoritarios responsables del aroma | 98 |

| | |
|--|----|
| Tabla 19. Anova para área por compuestos | 98 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Tabla 20. Prueba de múltiples rangos para área por compuestos | 99 |
|---|----|

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|------|
| ANEXO A. Datos experimentales de la metodología de superficie de respuesta | 117 |
| ANEXO B. Resultados cromatográficos para el cacao CCN51 en las condiciones óptimas por GC | 118 |
| ANEXO C. Cromatograma y tablas del cacao regional fermentado 5 días R-5 por GC-MS | 119 |
| ANEXO D. Resultados de muestras de cacao CCN51 de tres días diferentes | 122 |
| ANEXO E. Cromatograma del cacao regional fermentado 5 días R-5 por GC-MS | 125 |
| ANEXO F. Cromatograma del cacao regional fermentado 6 días R-6 por GC-MS | 126 |
| ANEXO G. Diferencias estimadas entre cada par de medias entre los 31 compuestos comunes en las dos muestras de cacao regional | 127 |
| ANEXO H. Diferencias estimadas entre cada par de medias para los 16 compuestos comunes y mayoritarios en las tres muestras de cacao | 135 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|--|
| ANOVA | Análisis de la Varianza. |
| °C | Grados celcius |
| CAR/PDMS | Carboxen-polidimetilsiloxano |
| CCN | Colección Castro Naranjal |
| CW/DVB | Carbowax/Divinilbenzeno |
| Cx | Concentración del compuesto de interés. |
| COVs | Compuestos orgánicos volátiles |
| DVB/CAR-PDMS | Divinilbenzeno/carboxen-polidimetilsiloxano |
| FID | Flame ionization detector (Detector de ionización en llama). |
| GC | Cromatografía de gases. |
| GC-MS | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. |
| GLP | Buenas Prácticas de Laboratorio |
| HS-SPME | Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza. |
| ICCO | Organización internacional del cacao |
| Ik | Índice de retención de Kovat's |
| IK E | Índice de retención de Kovat's experimental |
| IK T | Índice de retención de Kovat's teórico |
| min. | Minutos. |
| MWHD | Hidrodestilación asistida por radiación con microondas |
| PA | Poliacrilato |
| PAD | Detector de arreglo de fotodiodos |
| PCA | Análisis de componentes principales |
| PDMS | Polidimetilsiloxano. |
| PDMS/DVB | Polidimetilsiloxano /Divinilbenzeno |
| SPME | Microextracción en fase sólida. |
| Th | Theobroma |
| TR | Tiempo de retención |

GLOSARIO

Analíto: Hace referencia a una sustancia, la cual puede ser un ion, un elemento, o incluso un compuesto determinado, que se desea analizar.

Análisis de varianza (ANOVA): Prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Los ANOVA evalúan la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores.

Aroma: Este término se utiliza para hacer referencia a los olores o esencias que pueden ser detectadas tanto por hombres como por animales a través del sentido olfativo.

Coeficiente de variación: Es una medida de dispersión que describe la cantidad de variabilidad en relación con la media. Puesto que el coeficiente de variación no se basa en unidades, se puede utilizar en lugar de la desviación estándar para comparar la dispersión de los conjuntos de datos que tienen diferentes unidades o diferentes medias

Compuestos orgánicos volátiles (COVs): Los compuestos orgánicos son sustancias químicas que contienen carbono y se encuentran en todos los elementos vivos, se convierten fácilmente en vapores o gases. Junto con el carbono, contienen elementos como hidrógeno, oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre o nitrógeno

Desviación estándar: Es la raíz cuadrada de la varianza, es decir, la raíz cuadrada de la media de los cuadrados de las puntuaciones de desviación. La desviación estándar se representa por σ .

Diseño experimental: Es una técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental. Se manipulan deliberadamente una o más variables, vinculadas a las causas, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés.

Ensayo: También llamado análisis químico es un procedimiento para medir la concentración o cualquier otra propiedad química de una sustancia o material.

Fermentación: Es un proceso natural que ocurre en determinados compuestos o elementos a partir de la acción de diferentes actores y que se podría simplificar

como un proceso de oxidación incompleta, es realizada por diferentes bacterias y microorganismos en medios anaeróbicos, es decir, en los que falta aire

Fibras para SPME: Se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico.

Máxima deseabilidad: Busca un valor máximo deseable y que equivale a la unidad 1.

Muestra de referencia: Es un control utilizado para comprobar la calidad y la trazabilidad de la metodología analítica.

Matriz: Todos los componentes de la muestra que no son analitos.

Muestra de ensayo: Componentes de una población que se recogen y analizan

Optimización: Es encontrar el mínimo o el máximo de una función respecto a ciertas restricciones. Sin duda, alcanzar el mínimo o máximo es obtener la "mejor" solución entre otras soluciones factibles.

Secado: Es un método de conservación de alimentos, consistente en extraer el agua de estos, lo que inhibe la proliferación de microorganismos y dificulta la putrefacción. El agua suele eliminarse por evaporación (secado al aire, al sol, ahumado o al viento).

Tueste: Operación que consiste en poner algo al fuego, en especial un alimento, para que se seque sin llegar a quemarse y tome un color dorado y una textura crujiente

Varianza: Es una medida de dispersión definida como la esperanza del cuadrado de la desviación de dicha variable respecto a su media.

RESUMEN

El cacao es un producto muy apetecido en la industria de alimentos alrededor del mundo, principalmente por sus características organolépticas, el cacao producido por la asociación CORTEPAZ ubicada en la vereda San Luis Robles del municipio de Tumaco en el departamento de Nariño, ha sido galardonado en eventos internacionales, por sus características finas de aroma.

Para identificar los compuestos orgánicos volátiles responsables del aroma en cacao tostado y molido (Licor de cacao), que le dan las características de fino y de aroma; se aplicó la técnica microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME), se determinó las condiciones óptimas de extracción utilizando una muestra de cacao CCN51 como muestra de referencia analizando los analitos extraídos por cromatografía de gases (GC-FID). Según el diseño experimental de superficie de respuesta, las condiciones óptimas fueron, tiempo 50 minutos, temperatura 60°C y fibra DVB/CAR-PDMS.

Con las condiciones óptimas determinadas, se identificaron los COVs mayoritarios del cacao CCN51 y de cacao regional, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), comparando los resultados de índices de retención y espectros de masas experimentales con los reportados en bases de datos. Los resultados determinaron que en el cacao CCN51 los compuestos mayoritarios fueron el ácido acético y el 2-propanol el cual otorga aroma poco agradable. El cacao regional presentó compuestos como el ácido acético y la tetrametil pirazina, siendo la pirazina un compuesto que genera notas agradables; por lo tanto, presentó compuestos que le proporcionan mejores características organolépticas.

Esta investigación logró identificar un total de 33 COVs para el cacao regional fermentado 5 días, 36 COVs para el de 6 días y 39 COVs en el CCN51 fermentado por 9 días. Por lo tanto, la relación entre los días de fermentación y la cantidad total de compuestos identificados presentó una relación directamente proporcional.

ABSTRACT

In food industry around the world, cocoa is a much desired product, mainly due to its organoleptic characteristics, the Colombian cocoa has great appreciation for its quality, especially the cocoa produced by CORTEPAZ association located in San Luis Robles Township of Tumaco municipality in Nariño state, which is considered fine and aroma cocoa and has been awarded at international events.

To determine the volatile organic compounds responsible for flavor of fermented, dried, roasted and ground cocoa, known as cocoa liquor; the head space Solid phase micro extraction (HS-SPME) technique was applied and the extracted analytes were analyzed by gas chromatography (GC-FID). The optimal conditions for the extraction of flavor compounds using a reference CCN51 sample was determined and it was found that per the experimental design of surface response, the optimal conditions were time of 50 minutes, 60 ° C temperature and fiber DVB / CAR-PDMS.

With optimal conditions determined, it was proceeded to identify chemical compounds in CCN51 and regional cocoa liquor, by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), comparing the experimental results of retention index and mass spectrum with reported in databases. The results determined that cocoa CCN51 majority compounds were acetic acid and 2-propanol which gives an unpleasant aroma, and that regional cocoa majority compounds were acetic acid and tetramethyl pyrazine being pyrazine compound very important in the aromatic quality, generating pleasant notes. Therefore, the regional cocoa studied in this research show better organoleptic quality compared to CCN51.

The investigation identified a total of 33 VOCs for regional fermented cocoa of 5 days, 36 VOCs for 6 days and 39 VOCs in the CCN51 fermented for 9 days, this means that the fermentation was a decisive stage to produce VOCs. It can be concluded that the relation between fermentation days and the total number of identified compounds was a directly proportional relationship in this studies.

INTRODUCCIÓN

El aroma del cacao es el resultado perceptible de una cadena larga de transformaciones de la almendra de cacao, éstos incluyen los factores agronómicos, genéticos y ambientales tales como la variedad, composición del suelo, clima, altura de cultivo, modo de recolección del fruto, además procesos como la fermentación, secado, y tueste,¹ son determinantes en el desarrollo de la composición volátil responsable del aroma en las semillas de cacao. Estos elementos contribuyen con la formación de componentes orgánicos volátiles (COVs), los cuales generan el aroma característico del cacao.

Una etapa determinante en el desarrollo de la fracción volátil es la fermentación, éste es un proceso en el que se llevan a cabo reacciones de carácter bioquímico, las levaduras producen algunos compuestos aromáticos importantes como alcoholes y principalmente ácidos carboxílicos siendo el más importante el ácido acético. En la etapa de secado prosigue el desarrollo de la fracción volátil, además de ácidos y alcoholes, también se evidencia la presencia de ésteres, aldehídos y cetonas, siendo algunos de los compuestos más representativos el 2-metilbutanoato de etilo, 2-metilpropanoato de etilo, 2-feniletanol y 2-heptanol, los cuales producen notas aromáticas frutales, florales y cítricos. Por otra parte, en la etapa de tueste el cacao termina de adoptar las propiedades organolépticas más importantes, es aquí donde compuestos orgánicos volátiles como pirazinas que generan notas aromáticas a chocolate, tostado, nuez y madera, se incorporan a las diferentes familias orgánicas que determinan el aroma final. Compuestos de gran importancia en esta etapa son la tetrametil pirazina, trimetil pirazina, benzaldehído, 2-fenilacetaldehído y el linalol.²

En Colombia se cultiva principalmente la variedad Criollo (*Theobroma bovalifolium*), el cual presenta alta calidad organoléptica; estudios indican que el grano de cacao fresco posee una composición aromática poco importante de compuestos volátiles, el estireno presenta el 68.8% y la dimetilformamida el 8.5% de la fracción volátil total, mientras que alcoholes, aldehídos y cetonas presentaron bajas concentraciones.³

1 BRITO E et al. *Structural and chemical changes in cocoa (Theobroma cacao L.) during fermentation, drying and roasting*. Journal of Science of Food and Agriculture 81, (2000) p.281-288.

2 RODRIGUEZ J, ESCALONA HB, OROZCO I. et al.. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation and drying processes using principal components analysis. Food Research International 44: 250-258. 2011.

3 Gill M.; A. J. MacLeod and M. Moreau. Aroma components of cocoa beans proceedings of the 4 th Weurman flavor research symposium. Dourdan (France). In: Development in Food Science, Ed. J. Adda. Elsevier, Amsterdam. 10: (1985) p. 261-266.

Trabajos de Jeanjean realizados sobre almendras de cacao no fermentadas y secas están mayoritariamente constituidas por alcoholes (57%) y esterres (23%).⁴

Por lo tanto, el desarrollo de la fracción volátil está determinada principalmente por el tratamiento poscosecha, según el tipo de cacao, entre 15 y 30 compuestos nuevos han sido identificados en estudios recientes. La fracción volátil global del cacao fermentado y seco es 10 veces superior y más importante que las no fermentadas y secas.⁵

El tostado de los granos conduce a la disminución de la humedad desde 7% a 2,5%, reducción del contenido del ácido acético y desarrollo de compuestos aromáticos. Los precursores formados durante la fermentación y el secado son los que participan en la formación del aroma de origen térmico, siendo las principales reacciones químicas en esta etapa; las reacciones de Maillard, la caramelización de los azúcares, degradación de proteínas y reacciones menores como la síntesis e compuestos azufrados.⁶

Teniendo en cuenta que el cacao de variedad criollo es reconocido por ser fino y de aroma y que una vez tostado presenta un desarrollo mucho más importante de las características organolépticas, la investigación que se realizó se centra principalmente en la identificación de los componentes volátiles mayoritarios presentes en las semillas de cacao tostado y molido variedad criolla (*Theobroma bivalifolium*), cultivado en la asociación CORTEPAZ del municipio de Tumaco en el departamento de Nariño. Para ello se implementó el método de extracción conocido como “microextracción en fase sólida con espacio cabeza” (HS-SPME), la cual es una técnica ampliamente utilizada en los estudios de aroma, utilizando para el montaje y desarrollo del método, muestras de cacao comercial variedad CCN51, cultivado por la asociación, como material de referencia no certificado y además técnicas instrumentales de análisis como la cromatografía de gases (GC-FID) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), disponibles en los laboratorios especializados de la universidad de Nariño. Una vez obtenidas las mejores condiciones de extracción y análisis, se realizó los ensayos para la identificación de los compuestos volátiles mayoritarios del cacao de variedad criollo (cacao regional) procedente del municipio de Tumaco, recolectado y preparado de igual manera por la asociación CORTEPAZ, reconocido por sus características finas de aroma.

4 Jeanjean N. Influence du génotype, de la fermentation et de la torréfaction sur le développement de l'arôme. Rôle des précurseurs d'arôme. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II. Francia. (1995) p. 200.

5 *ibid.*, p. 200

6 Dimick P. S. and J. M. Chemico-physical aspects of chocolate processing. A review. Can. Inst. Food Sci. Technol. 14 (4): (1981) p. 269-282.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Identificar los compuestos químicos volátiles mayoritarios presentes en semillas tostadas y molidas de cacao de la variedad criollo (*Theobroma bovalifolium*), provenientes de la asociación CORTEPAZ del municipio de Tumaco.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar las mejores condiciones de extracción HS-SPME para los compuestos volátiles mayoritarios de una muestra de cacao comercial de la variedad CCN51 utilizando cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)
- Identificar los compuestos volátiles mayoritarios de las semillas tostadas de cacao criollo (*Theobroma bovalifolium*), mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Realizar una comparación de los compuestos químicos volátiles mayoritarios responsable del aroma teniendo en cuenta la variedad y días de fermentación del cacao, mediante análisis de varianza.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Antecedentes

En el mundo se realizan actualmente esfuerzos para mejorar el sector cacaotero debido a las falencias en temas de calidad que este sistema productivo tiene, los trabajos de investigación tienen como finalidad principal enriquecer el conocimiento general, mejorar las técnicas de cultivo, cosecha y pos cosecha, identificando las principales características que afectan la calidad del grano (aroma y sabor) y a la vez impulsar el desarrollo de nuevos productos a base de cacao. Una parte fundamental que determina las características especiales del cacao regional es el aroma y este se relaciona directamente con los compuestos volátiles que contiene.⁷

Estudios químicos correspondientes a la fracción volátil de las semillas de cacao incluyen principalmente la extracción de aceites esenciales de las semillas. OKAYAMA y colaboradores señalan que las semillas contienen un aceite esencial que le da un sabor aromático particular, el cual contiene 50% de linalool ($C_7H_{17}OH$) y algunos esteres.⁸

La investigación llevada a cabo en la universidad de Nariño por LEON y colaboradores, estudia la extracción del aceite esencial de las semillas de cacao utilizando como método de extracción hidrodestilación asistida por radiación con microondas, se realizó un análisis por GC-FID de los compuestos presentes mediante comparación de índices de Kovats y se identificó por MS un total de 24 compuestos oxigenados y una amina. En este mismo trabajo se extrajo los metabolitos secundarios volátiles responsables del aroma del aceite esencial usando micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) y se identificó por GC-FID 13 compuestos, siendo el mayoritario el Benzoato de isobutilo.⁹

7 SEGUINE E. "Cacao flavor through genetics- anatomy of fine flavor". [Citado octubre 2016]. Disponible en: http://www.finechocolateindustry.org/Resources/Documents/mc_HCP_2014_12_1.pdf

8 OKAYAMA. *Cocoa of Theobroma*. [Citado agosto 2014]. Disponible en internet: URL: <http://www.okayama-u.ac.jp/doc/lab.html>. 2003.

9 LEON J; LOPEZ J. "Identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de las semillas de cacao (*Theobroma cacao L*) por GC/FID/MSD". San Juan de Pasto, 2005. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, departamento de Química.

La investigación de PORTILLO y colaboradores relaciona las características aromáticas del cacao con los tratamientos de pos cosecha del fruto. Para caracterizar los roles de la fermentación y del secado, se realizaron una serie de ensayos concernientes a la calidad aromática del cacao tipo Criollo. Variando las condiciones de fermentación (0 y 5 días), las remociones para aireación (a las 24 horas, a las 48 horas y 72 horas) y 3 épocas de cosecha, para un total de 18 ensayos y 90 muestras. Los compuestos volátiles fueron extraídos mediante la técnica de arrastre por vapor y analizados por cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas. Los resultados obtenidos mostraron que el tiempo de fermentación y la época de cosecha fueron los principales factores responsables de las diferencias en el contenido de compuestos volátiles. Se identificaron 92 compuestos volátiles en el cacao no secado, distribuidos en 13 familias químicas. De igual manera, 121 compuestos volátiles fueron identificados en el cacao seco. Estos compuestos pertenecen a 14 familias de compuestos químicos. Las tres familias más representativas cualitativamente fueron los ésteres, alcoholes y los ácidos. Este trabajo permitió tener una aproximación de los papeles respectivos de la fermentación y el secado sobre el aroma del cacao.¹⁰

El trabajo de SANCHEZ evaluó la remoción (aireación) durante la etapa de fermentación en la calidad sensorial del cacao (*Theobroma cacao L.*), siendo la fermentación un factor que genera cambios bioquímicos que determinan el aroma y el sabor del cacao. Según este estudio una buena remoción de la masa de almendras de cacao favorece la homogenización de la fermentación; mientras que su ejecución defectuosa o no realización, hace que una gran proporción de su masa se quede sin fermentar. El autor refiere que, en el cacao tipo criollo, el primer mezclado debe realizarse a las 24 horas y, en el caso de tipos forasteros y trinitarios se ejecutará cada dos días; evitando la proliferación de hongos y la desecación de almendras de la superficie.¹¹

LOAYZA analizó dos tratamientos de remoción T1 y T2. Para el T1 tomó como referencia el Protocolo de Amores; quien fija como frecuencia de remoción las 24h, 72h y 120h. A las 144h (sexto día), se corta la fermentación y se retiran las semillas del fermentador, para ser expuestos en sus respectivos secadores solares.¹² Durante el T2, las remociones de la masa se realizaron cada 24 horas (24h, 48 h, 72 h, 96 h y 120h) y al igual que en T1, al sexto día se interrumpió la fermentación y las semillas fueron retiradas para ser secadas. Las características organolépticas fueron evaluadas mediante catadores y por HS-SPME.

10 PORTILLO E, et al. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao L.*) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. Revista Científica UDO Agrícola 9 (2), (2009) p.458-468.

11 SÁNCHEZ, C. V. A. "Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao L.*), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial". Ecuador, 2007. Tesis de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad Técnica Estatal de Quevedo Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Ingeniería Agrónoma.

12 AMORES F, et al. "Project to establish the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate fine or flavour and bulk cocoa". (2007). Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quevedo – Ecuador.

El sabor del cacao presentó intensidad fuerte para ambos tratamientos; siendo ligeramente mayor en el T2. La intensidad de la acidez para el T2 es moderada, considerándose aceptable para su comercialización, mientras que la intensidad es leve para el T1. Para ambos tratamientos; las intensidades de los sabores de amargor, astringencia y sabor a nueces, son leves y sus diferencias son mínimas. El método instrumental reporta que el contenido de pirazinas, responsables del sabor y aroma a cacao, es mayor para el T1 que para el T2.¹³

RODRIGUEZ desarrollo una investigación en la que aplicó la técnica de micro extracción en fase solida con espacio de cabeza (HS-SPME) directamente a las semillas de cacao, analizó el perfil de compuestos volátiles del cacao tipo Forastero en las etapas de fermentación, secado y tostado, además realizó variaciones de tiempo y temperatura de extracción. En la evaluación del efecto del tiempo de fermentación y la temperatura de secado sobre el perfil de compuestos volátiles del cacao se aislaron 58 compuestos volátiles, donde la fermentación por 6 días y secado al sol generaron compuestos volátiles deseables; sobre el efecto del tostado en los compuestos volátiles del cacao se identificaron 70 compuestos y se determinó que son mejores las temperaturas menores a 145 °C con tiempos prolongados, para evitar la degradación de compuestos deseables.¹⁴

ALVAREZ y colaboradores desarrollaron el estudio de los compuestos volátiles más relevantes en granos tostados y cosechados en una plantación de cacao de variedad criollo de la zona Occidental de Venezuela, usando la técnica de micro extracción en fase sólida por espacio de cabeza acoplada con cromatografía de gases y espectrometría de masas. Los resultados revelaron que en el cacao tostado fueron identificados 69 compuestos volátiles agrupados en 12 familias de compuestos químicos, siendo los aldehídos, alcoholes, ácidos y pirazinas con los niveles más altos según sus contenidos.¹⁵

En la universidad de los Andes, QUIJANO y colaboradores analizaron la pulpa de dos especies de cacao *Th.bicolor*, llamada cacao maraco y *Th. cacao L.*, conocido como cacao criollo.

13 LOAYZA W. "Influencia de la frecuencia de remoción, durante la fermentación, en la calidad sensorial del cacao (*Theobroma Cacao, L.*) de Satipo". Lima Perú. 2014. Tesis de grado (Químico). Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad De Química E Ingeniería Química, E.A.P. De Ingeniería Química.

14 RODRÍGUEZ J. "Estudio de los compuestos volátiles de *Theobroma cacao L.*, durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado". México, D.F. junio de 2011. Tesis de doctorado. Instituto politécnico nacional. Escuela nacional de ciencias biológicas.

15 ALVAREZ C et al. *Identificación de los compuestos aromáticos en el cacao criollo de Venezuela usando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases*. Vitae, vol. 19, núm. 1. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2012. p. 370-372.

El análisis cromatográfico se realizó mediante GC-FID y GC-MS. En total se identificaron 127 y 68 compuestos volátiles en *Th. bicolor* y *Th. cacao*, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas respecto a la composición de ésteres, alcoholes y ácidos.¹⁶

El análisis de la influencia que tienen los tratamientos pos cosecha en el desarrollo de la fracción volátil del cacao, incluyen la identificación química y cuantificación de estos componentes, para ello se incluyen nuevas metodologías con la incorporación de técnicas analíticas, donde se hace necesario realizar optimizaciones con el objetivo de sacar el mayor provecho de las muestras vegetales, estas metodologías incluyen la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME), mencionada anteriormente pero se incluye una estandarización del método, seleccionando fibras, tiempos y temperaturas adecuados así como las condiciones de análisis por cromatografía de Gases y la espectrometría de masas.¹⁷

El estudio llevado a cabo en la universidad de Salford en Manchester por MILLARES se enfocó en encontrar las mejores condiciones de extracción por la técnica de micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) en el análisis de los componentes volátiles del cacao; se evalúa diferentes tipos de fibras, tiempos y temperaturas de extracción; los mejores resultados se obtuvieron con la fibra divinylbenzene /carboxen /polydimethylsiloxane (DVB/CAR-PDMS), con un tiempo de exposición de la muestra a la fibra de 15 minutos y una temperatura de 60°C. La identificación se realizó mediante el uso de un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS), obteniéndose pirazinas, aldehídos, ésteres y el ácido acético como principales influencias en el aroma característico del cacao.¹⁸

Actualmente el papel que tiene el cacao en el departamento de Nariño es más relevante, puesto que se ha consolidado como una importante fuente de ingresos, principalmente en la región pacífica nariñense, donde el licor de cacao (Cacao tostado y molido) producido ha sido reconocido internacionalmente como uno de los mejores cacaos finos y de aroma; a pesar de esto, aún no se han realizados estudios que determinen las características químicas de la composición volátil de las semillas de cacao regional.

16 QUIJANO C¹, CEBALLOS L², PINO J³. *Análisis de compuestos volátiles en dos especies de Theobroma mediante HS-SPME*. ¹ Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Dpto. de Química, Bogotá, Colombia. ² Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba. ³ Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Habana, Cuba.

17 DUCKI S. et al. "Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the head space analysis of volatile compounds in cocoa products". Science Direct. Talanta 74 (2008) p. 1166-1174.

18 MIRALLES-GARCIA J. Chemical Composition and Flavour- Development of Cocoa Products by Thermal and Enzymatic Technologies. Thesis Ph. D. University of Salford, A Greater Manchester University, School of Environment and Life Sciences. 2008.

Un estudio relacionado al aroma que se han llevado a cabo en la Universidad de Nariño conciernen a la implementación del método de extracción e identificación del aroma de semillas de café tostado y molido por medio de la técnica de micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) y el análisis de los compuestos volátiles mayoritarios por cromatografía de gases GC-FID. Con los resultados obtenidos se pudo concluir que 14 compuestos volátiles establecen el aroma característico del café regional y además se determinó las condiciones óptimas de extracción y análisis demostrando la importancia de determinar las condiciones de extracción y análisis por medio de estas técnicas.¹⁹

2.2 MARCO TEORICO

2.2.1 El cacao

El término cacao (cocoa en inglés) se deriva de la expresión “*cacahuatl*” que proviene de las lenguas Mayas y Aztecas²⁰. El árbol de cacao, clasificado por Linneo como *Theobroma cacao* L. (en latín “cacao, alimento de dioses”), de la familia *Esterculáneas* es originario de Sudamérica, concretamente de los valles del Amazonas y Orinoco.²¹

Imagen 1. Árbol y frutos del cacao



Fuente: Casa Luker. 2011. Imágenes de archivo.

19 BASTIDAS A. “Estudio Químico De Los Componentes Volátiles (HS-SPME) Y Análisis De La Composición De Taninos Y Cafeína En Un Tipo De Café Tostado Y Molido Tradicional Colombiano”. San Juan de Pasto. 2010. Tesis de grado (Químico). Universidad de Nariño, programa de Química.

20 CALA R. *Las voces prehispanas cacao, cacahuete y maíz en diccionarios generales de lengua castellana, catalana e italiana del siglo XX*. *Boletín Americanista*, 51, p. 25-41.2001.

21 LLAMAS O. El cacao. *Revista de la asociación nacional de tiendas de autoservicio y departamentales*, A.C. (ANTAD), 2007.

El cultivo del cacao requiere temperaturas entre los 18 y 32°C, lluvias distribuidas a lo largo del año en un rango de 1.000 a 4.000mm/año y una humedad del 70-80% durante el día y del 90-100% durante la noche. Los frutos son una baya grande y oval que cuando son maduros tienen una longitud variable, entre 100mm a 350mm y un peso que puede oscilar desde 200g hasta aproximadamente 1kg.²²

Las variedades de cacao son clasificadas por sus características aromáticas de acuerdo a los compuestos aromáticos que presentan, ya que estos a su vez tienen asociación con los descriptores de olor y aroma. Las principales variedades son *Criollo*, *Forastero* y *Trinitario*.²³

- Variedad *Criollo* (*Theobroma bovalifolium*): conocido como cacao fino, supone un 5% de la producción mundial de cacao, es una de las variedades más apreciadas por el tipo de fruto que proporciona puesto que es aromático, afrutado y dulce, aunque tiene bajos rendimientos. Se cultiva principalmente en Centro y Sur América, aunque cada vez en menor proporción por su susceptibilidad a padecer enfermedades.²⁴
- Variedad *Forastero* (*Theobroma cacao L.*): se obtiene de árboles que crecen más rápidamente y producen mejores rendimientos que el criollo. Se cultiva en África y en algunos países de Centro y Sur América. Esta variedad incluye otras como: el Común en Brasil, el Amelonado de África en el este de África, el Matina o Ceylan en Costa Rica y el Cacao Nacional de Ecuador denominado Arriba, el cual produce granos con un aroma agridulce, por lo cual se le reconoce como uno de los cacaos más finos del mundo, a pesar de provenir de una variedad que produce cacao “ordinario”.²⁵
- Variedad *Trinitario* (*Theobroma de celian*): es una variedad obtenida por el cruce entre criollo y forastero, tiene un sabor condimentado (especies) y un aroma florido. Esta variedad se comenzó a sembrar en Trinidad y Tobago, después se extendió a Venezuela, Ecuador, Camerún, Sri Lanka, la Isla de Java y Papúa Nueva Guinea. Se cultiva en Centroamérica y Asia. Es mucho más resistente a las enfermedades y es el cacao más utilizado en la mayor parte del mercado del cacao y del chocolate.²⁶

22 FRAUENDORFER F. SCHIEBERLE P. “Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, p.10244-10251.2008

23 AFOAKWA E. *Chocolate Science and Technology*. University of Ghana, Legon – Accra. Ghana. New Delhi, India. p. 13. 2010.

24 ARGUELLO, O.; MEJÍA, A. & PALENCIA, G. Clasificación de especies cultivares de *Theobroma cacao L.* para el mejoramiento del sistema de multiplicación de cacao. Corpoica – Colombia. p. 11. 2000.

25 CALDERÓN L., “Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao L.*) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad”. Tesis de Lic. En Química, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito – Ecuador, 2002.

26 SUKHA D. Desarrollo de Aromas del Cacao, UWI, Trinidad & Tobago, 2008.

Imagen 2. Variedades de cacao. a) Criollo, b) Forastero, c) trinitario.



Fuente. Casa Luker. 2011. Imágenes de archivo

Existen otra clase de cacaos, conocidos como híbridos, éstos se obtienen mediante el cruce de dos progenitores debidamente caracterizados mediante polinización manual. En la actualidad existe una gran cantidad de cacaos híbridos, los cuales presentan características de alto rendimiento, tolerancia a enfermedades y precocidad, por lo tanto, se ven mayormente favorecidos comercialmente debido a que son mucho más resistentes.

Uno de los híbridos más importantes es el de referencia CCN 51 (que significa Colección Castro Naranjal), el cual es un cacao de alta productividad en la mayoría de los sectores cacaoteros, es de fácil comercialización y adquisición. En Colombia su cultivo y comercialización se derivan principalmente por la resistencia a enfermedades, la normatividad para regular la propagación y comercialización de material vegetativo de cacao está a cargo del instituto colombiano agropecuario - ICA, quién a través de la resolución No. 00474 de 2002 estableció las normas mínimas para producir clones de cacao en forma masiva.²⁷ Partiendo especialmente de que este clon cuenta con un amplio reconocimiento en la industria del cacao y que se cultiva principalmente en el departamento de nariño; fue la muestra de referencia empleada para la realización de los ensayos de esta investigación para determinar las mejores condiciones de extracción por HS-SPME de los compuestos organicos volátiles.²⁸

El CCN51 (Imagen 3) se caracteriza por ser un cultivo precoz pues inicia su producción a los 24 meses de edad, no necesita de polinización cruzada para su adecuado fructificación tal como la mayoría de los clones y es tolerante a la “Escoba de Bruja”, enfermedad que ataca a la mayoría de variedades de cacao destruyendo su producción.

²⁷ Normas para la producción, distribución y comercialización de material de propagación vegetativa de cacao. Disponible en: http://www.avancejuridico.com/actualidad/documentosoficiales/2002/44736/a_ica_00474_2002.html

²⁸ FEDECACAO. Materiales de cacao en Colombia su compatibilidad sexual y modelos de siembra. Documentos técnicos. p. 12. Bucaramanga. 2009.

Entre las características de este clon podemos citar su excelente índice de mazorca: 8 mazorcas/libra de cacao seco en comparación con el índice promedio de 12 mazorcas/libra; excelente índice de semillas: 1.45 gr/semilla seca y fermentada comparado con el índice promedio de 1.2 gr/semilla seca; su adaptabilidad es reconocida, ya que es un clon cosmopolita que se adapta a casi todas las zonas tropicales tiene un alto porcentaje de manteca (54%), lo que lo hace cotizado por las industrias.²⁹ Sus mazorcas son de color rojo- anaranjado en estado de madurez. Respecto a las notas del catador se ha establecido que este cacao presenta alta acidez y amargor y bajo sabor a chocolate.³⁰

Imagen 3. Cacao CCN51



Fuente: Anecacao. Imagen de archivo

2.2.2 Factores que afectan la calidad del aroma en el grano de cacao.

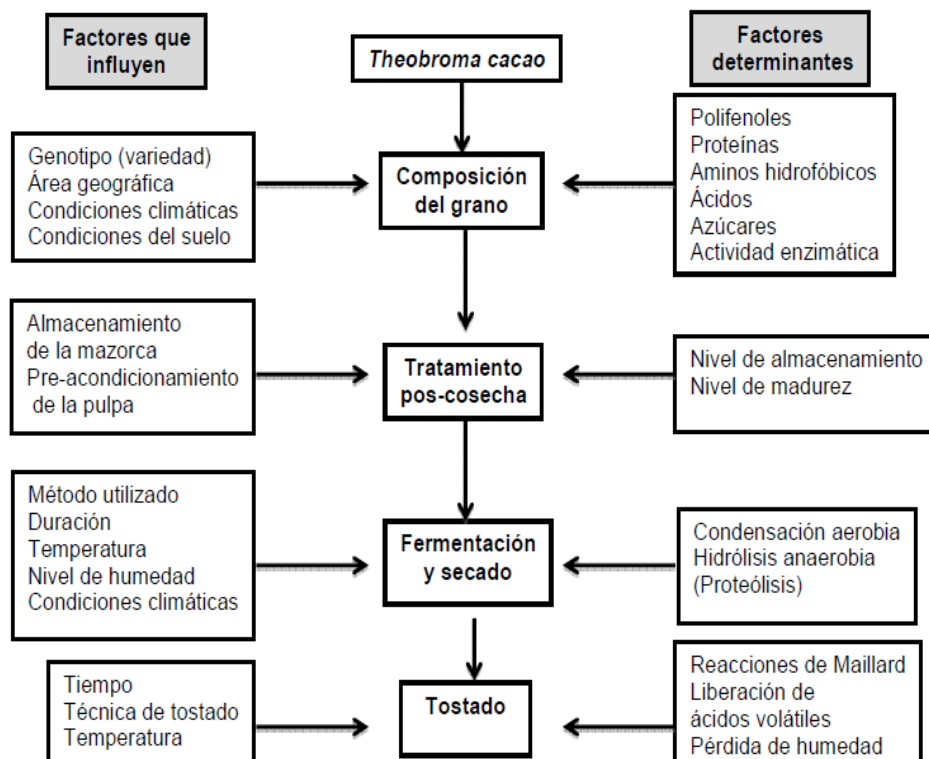
Existen diferentes factores pos cosecha que afectan las características del cacao (Diagrama 1), entre las que destacan la fermentación, secado y el tostado, que a su vez definen la calidad final de los productos del cacao, como el chocolate.³¹

29 ANECACAO, Origen del Cacao en el Ecuador: Características de los Cacaos Finos y Ordinarios, Primera Edición, Quito-Ecuador, 2004.

30 NAVIA A. PAZMIÑO N. "Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación". Tesis de grado para la obtención del título: Ingenieros De Alimentos. Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil – Ecuador. 2012.

31 AFOAKWA et al. 2010. Op Cit. p. 27

Diagrama 1. Factores que afectan el aroma del cacao durante las diferentes etapas del procesamiento.



Fuente: Estudio de los compuestos volátiles de *Theobroma cacao* L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado. Jacobo Rodríguez. Tesis de doctorado. México. 2011.

2.2.2.1 Fermentación del cacao

La fermentación del grano de cacao es un proceso esencial para el desarrollo apropiado de los precursores del sabor. Esta etapa tiene dos objetivos principales: (1) Remover el mucilago, permitiendo la aireación del grano durante la fermentación y facilitar el proceso de secado; (2) Proveer el calor y el ácido acético necesario para inhibir la germinación.³²

El proceso de fermentación inicia con la apertura de la mazorca y la extracción de las semillas de cacao. Es un proceso espontáneo que usualmente se realiza en cajas de madera; en el transcurso de este proceso el grano de cacao es removido de un contenedor a otro con el objetivo de introducir aire y favorecer la fermentación aerobia.³³

³² THOMPSON S. MILLER K. LOPEZ A. "Cocoa and coffee". Food microbiology, fundamentals and frontiers, second edition. Washington DC, (2001): American Society for Microbiology. p.721- 733.

³³ AFOAKWA et al. 2010. Op Cit. p. 27.

Las semillas al momento de ser extraídas están envueltas en una pulpa mucilaginosa de color blanco que comprende el 40% del peso en base húmeda del cacao fresco. La pulpa mucilaginosa está compuesta principalmente por 87% de agua, 2.7% pentosas, 0.7% sacarosa, 10% glucosa y fructosa, además de 0.6% de proteínas, 0.7% ácidos y 0.6% de sales inorgánicas. Esta composición hace a la pulpa un excelente sustrato para el crecimiento microbiano.³⁴

Durante la apertura de la mazorca se transfieren a las semillas diferentes microorganismos, como las levaduras *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces rosei*, *Hansenula anomala* y *Pichia fermentans*, éstas levaduras llevan a cabo el proceso de fermentación, transformando los azúcares sencillos del

mucílago o pulpa en etanol, degradando la pectina, lo que modifica la textura del grano, elimina el ácido cítrico y como consecuencia una disminución de la acidez. Por otro lado, el consorcio de levaduras consume el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias lácticas como *Lactobacillus* (*Lb. Collonides*, *Lb. fermentum*, *Lb. mali* y *Lb. plantarum*) y *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, y *Pediococcus acidilactici*, que fermentan los carbohidratos residuales y continúan el consumo del ácido cítrico. Las levaduras contienen enzimas del tipo “pectinolítico”, lo que les permite hidrolizar las pectinas, ocasionando una disminución de la viscosidad de la pulpa de mucílago y favoreciendo la entrada de aire. Con este ambiente aerobio y menos ácido (debido al consumo de ácido cítrico) se favorece el desarrollo de bacterias acéticas que llevan a cabo la transformación del etanol que produjeron las levaduras en ácido acético, dado que esta transformación es una reacción exotérmica se produce calor.³⁵

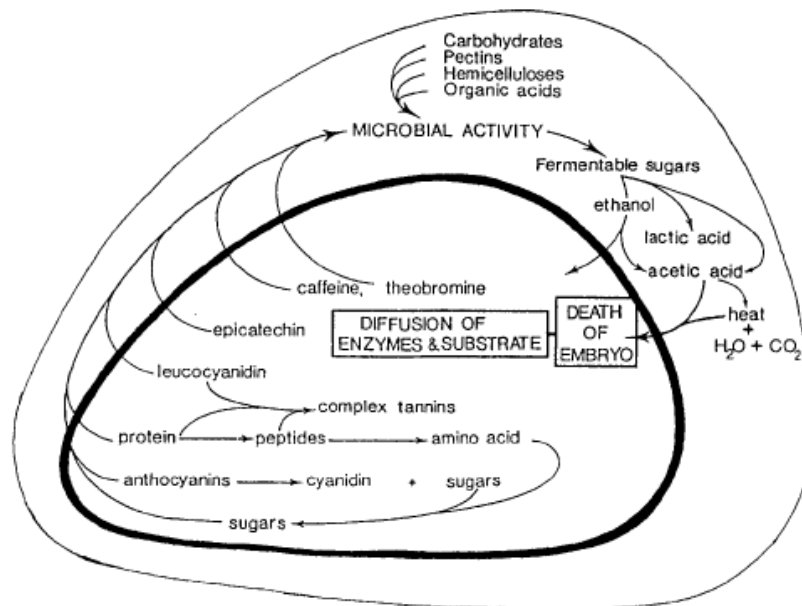
Posteriormente en la fermentación el etanol y el ácido acético se difunden hacia el interior de los granos y, junto con la temperatura alta, matan al embrión. Las más importantes bacterias acéticas que se han aislado de la fermentación del cacao, son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*. En la última fase de la fermentación se detectan bacterias del género *Bacillus* las cuales producen numerosas enzimas que catalizan reacciones de degradación de proteínas a aminoácidos como la valina, glicina L-treonina y L-serina; las bacterias más importantes son *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y *B. subtilis*.³⁶ Éste proceso se puede observar en la imagen 4.

34 THOMPSON S. Op Cit. p.726.

35 WACHER M. Microorganismos y chocolate. Revista Digital Universitaria Volumen 12 Número 4 ISSN: 1067-6079. 1 de abril 2011. p. 4-5.

36 Ibíd. p. 5-6

Imagen 4. Proceso de fermentación en la semilla de cacao



Fuente: GUERRERO Y. Proceso de fermentación del cacao. Facultad de ingeniería agroindustrial. Universidad nacional de San Martín. Perú. p. 9.

Como se aprecia en la imagen 4, la cáscara de la semilla es permeable a muchas sustancias de bajo peso molecular, por tal motivo, el etanol, el ácido acético, como también otros metabolitos son absorbidos conjuntamente con el agua. La semilla se hincha y tiene cambios físicos, y químicos.³⁷

Por otra parte, se puede observar tres clases de compuestos polifenólicos en el interior de la semilla, catequinas (37 %), antocianinas (4%) y leucocianidinas (58%), estos se encuentran almacenados en las células de pigmentos de los cotiledones, durante esta etapa, las antocianinas presentan reacciones de hidrólisis enzimática, los cotiledones pierden su color violeta, adquiriendo una coloración más clara, pues la cianidina liberada adquiere la forma de pseudobase, incoloro en las condiciones existentes, a su vez las leucocianidinas se difunden a través del líquido celular, se oxidan y enseguida se condensan en moléculas de elevado peso molecular, como taninos.³⁸

³⁷ GUERRERO Y. Proceso de fermentación del cacao. Facultad de ingeniería agroindustrial. Universidad nacional de San Martín. Perú. p. 9.

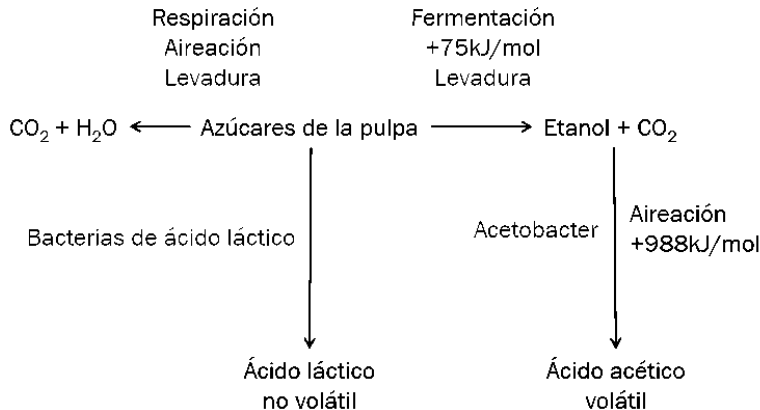
³⁸ Ibid. p.10

- **Desarrollo de la fracción volátil del cacao durante la fermentación.**

La fermentación es considerada como una etapa clave en la formación de los compuestos orgánicos volátiles del cacao. Durante este proceso, el grano tiene modificaciones en el contenido de los compuestos implicados en el desarrollo de la fracción volátil de origen térmico. Además, se genera una fracción volátil de origen bioquímico y microbiológico que es cualitativa y cuantitativamente muy importante.³⁹

La concentración de la fracción volátil global en el cacao bien fermentado y seco, es 10 veces mayor que la del cacao no fermentado y seco. En los últimos días de fermentación levaduras como *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *chevalieri*, *Candida* sp., y *Kluyveromyces marxianus* producen compuestos aromáticos, principalmente alcoholes y ésteres de ácidos grasos, como son el acetato de isopropilo, acetato de etilo (producto de la reacción entre el ácido acético y el etanol), metanol, 1-propanol, 3-metil-1-butanol, 2,3-butanediol, dietil succinato y feniletanol.³⁷ Por otra parte, el *bacillus subtilis* es el responsable de formar los precursores responsables de la formación de la tetrametil pirazina.⁴⁰ La reacción general del proceso de fermentación se puede apreciar en la imagen 5.

Imagen 5. Reacción general de fermentación.



Fuente: Fermentación del Cacao

39 CROS. "Factores condicionantes de la calidad del cacao". Memorias del primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. (2000) Venezuela.

40 XIAO Z. et al. Accelerated green process of tetramethylpyrazine production from glucose and diammonium phosphate. Biotechnology for biofuels. (2014) p. 2.

Como se puede apreciar luego de esta revisión, durante la fermentación, se desarrollan principalmente las familias de los ácidos carboxílicos, alcoholes y ésteres por la influencia de diferentes levaduras y bacterias, además se generan los precursores de otras familias orgánicas como aldehídos, cetonas, pirazinas, pirroles, entre otros.

2.2.2.2 Secado del cacao

El principal objetivo de esta etapa es la reducción de la humedad del grano, evitando el desarrollo de hongos y facilitando el almacenamiento, manejo y comercialización del cacao. Tradicionalmente, el secado del cacao se lleva a cabo por exposición de los granos al sol o por métodos de secado artificial.⁴¹ Se han encontrado diferencias entre cacao secado al sol y el secado de forma artificial, el cacao secado de forma artificial presenta mayor acidez que el secado al sol, además de que la reducción del contenido de ácidos grasos volátiles en el secado artificial es menor que en el secado al sol. Este fenómeno probablemente se debe a que los ácidos grasos volátiles presentan más baja difusividad que el agua y a que la testa del grano se endurece durante el secado, disminuyendo la transferencia de masa.⁴² El secado artificial se realiza con temperaturas superiores a los 60°C para acelerar el proceso y se ha reportado que altas temperaturas de secado producen efectos negativos en las características finas y de aroma del cacao.⁴³

- **Desarrollo de la fracción volátil del cacao durante el secado.**

Es muy importante que la humedad disminuya lentamente para favorecer las reacciones de oxidación, responsables del sabor y aroma del cacao, si se hace rápido, se corre el riesgo de inactivar las enzimas. Durante esta etapa continúan las reacciones iniciadas en la fermentación, las principales se conocen como pardeamiento enzimático, que conduce a la variación del color y desarrollo del sabor, en este proceso las reacciones de oxidación de los polifenoles son acelerados debido a la mayor presencia de oxígeno, en el caso de las cianidinas (generadas en la fermentación), se oxidan bajo la acción de la polifenoloxidasas, desenvolviéndose la coloración típica del cacao; por otra parte, disminuye el contenido de ácido acético por su carácter volátil, reduciendo la astringencia en las almendras. En la imagen 6 se observa el mecanismo general de la reacción de pardeamiento enzimático.⁴⁴

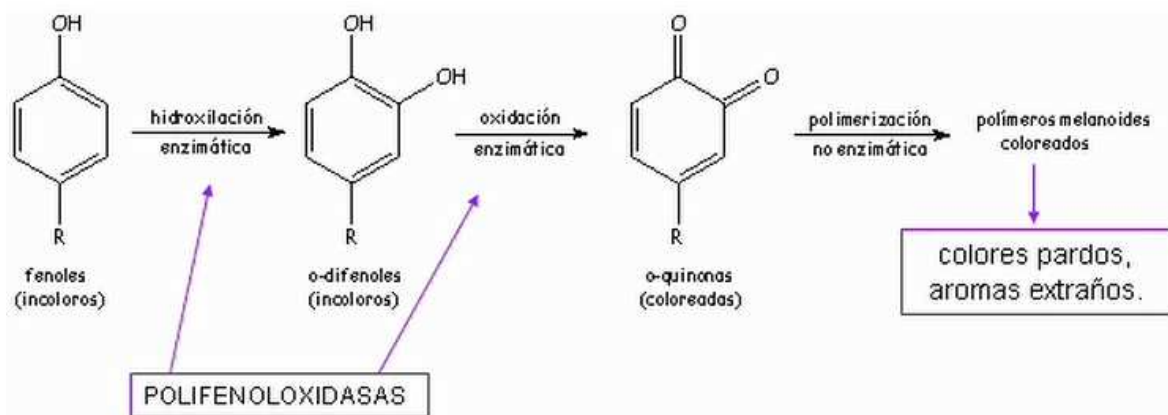
41 ORTIZ L. et al. "Influencia de varios factores sobre características del grano del cacao fermentado y secado al sol". *Agronomía Tropical*. 59(2), (2009) p.119-127.

42 GARCÍA P. et al. Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. *Journal of Food Engineering* 79: (2007) p.1159-1165.

43 HUI C. et al. Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems Engineering* 102. (2009) p.153-161.

44 GILCES H. SANMARTÍN F. Análisis y selección de proceso de secado de cacao y diseño de prototipo de una unidad secadora tipo plataforma. Tesis de pregrado. Universidad estatal de milagro, unidad académica ciencias de la ingeniería. Ecuador. 2013.

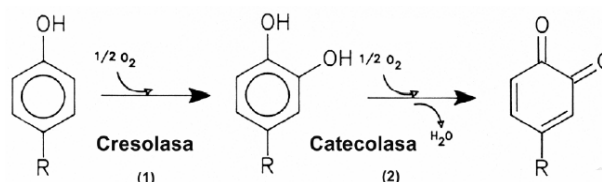
Imagen 6. Reacción general del pardeamiento enzimático.



Fuente: Universidad nacional abierta y a distancia.

La cadena de reacciones que tiene lugar en el pardeamiento puede dividirse en dos fases, la primera enzimática y la segunda no enzimática. La primera etapa consiste en la conversión de monofenoles a quinonas, inicialmente se hidroxilan las monofenoles en o-difenoles y luego estos últimos son oxidados a o-quinonas (Imagen 7). Ambas reacciones son catalizadas por la polifenol oxidasa.

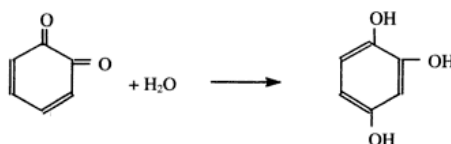
Imagen 7. Reacciones de conversión de monofenoles a o-quinonas.



Fuente: Mecanismo de reacción del pardeamiento enzimático, [Citado 9 febrero de 2017]. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/11616/Modulo_exe/Exe%20del%20modulo/leccin_11_pardeamiento_enzimtico.html

Luego de haber sido generadas las quinonas pueden ser hidroxiladas de forma secundaria al reaccionar con moléculas de agua presentes en el medio, así se obtienen los trihidroxibencenos (Imagen 8).

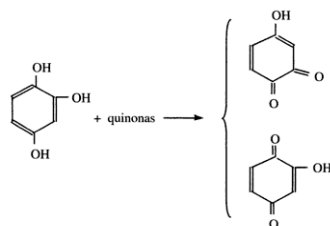
Imagen 8. Hidroxilación de quinonas a trihidroxibencenos.



Fuente: Mecanismo de reacción del pardeamiento enzimático, [Citado 9 febrero de 2017]. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/11616/Modulo_exe/Exe%20del%20modulo/leccin_11_pardeamiento_enzimtico.html

Debido a su alta reactividad los compuestos trifenólicos reaccionan con las quinonas presentes en un intercambio de moléculas que produce las hidroquinonas.

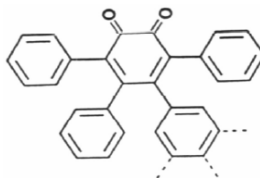
Imagen 9. Producción de hidroquinonas.



Fuente: Mecanismo de reacción del pardeamiento enzimático, [Citado 9 febrero de 2017]. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/11616/Modulo_exe/Exe%20del%20modulo/leccin_11_pardeamiento_enzimtico.html

Las hidroquinonas (Imagen 9) participan en reacciones de condensación oxidativa en las que se forman los polímeros denominados melaninas (Imagen 10), al inicio estos compuestos presentan un amplio espectro de color que pasa por tonos rosados, rojizos y azulados, para finalmente llegar a la coloración parda o negruzca que los caracteriza.⁴⁵

Imagen 10. Estructura de polímero formado en el pardeamiento enzimático.



Fuente: Mecanismo de reacción del pardeamiento enzimático, [Citado 9 febrero de 2017]. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/11616/Modulo_exe/Exe%20del%20modulo/leccin_11_pardeamiento_enzimtico.html

Las familias de ésteres, aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos presentan la mayor cantidad de compuestos en esta etapa del proceso.⁴⁶ El aroma del cacao seco es dominado por los ácidos carboxílicos de cadena corta, especialmente por el ácido acético y el ácido 3-metilbutanoico. Estos ácidos le confieren un olor a vinagre, agrio y rancio al cacao, motivo por el que son indeseables en altas concentraciones. Mientras que otros compuestos como 2-metilbutanoato de etilo, 2-metilpropanoato de etilo, 2-feniletanol y 2-heptanol contribuyen al aroma global del cacao, produciendo notas aromáticas frutales, florales y a cítricos.⁴⁷

⁴⁵ Mecanismo de reacción del pardeamiento enzimático, [Citado 9 febrero de 2017]. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211616/Modulo_exe/Exe%20del%20modulo/leccin_11_pardeamiento_enzimtico.html

⁴⁶ PORTILLO E. et al. Op Cit. 461.

⁴⁷ FRAUENDORFER F, SCHIEBERLE P. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: (2006) p.5521-5529.

2.2.2.3 Tostado del cacao

El tostado del cacao es la operación más importante en la industrialización del mismo. En esta etapa continúa la generación del olor y aroma característico del chocolate a partir de los precursores del sabor formados durante la fermentación y el secado. Antes del tostado el grano de cacao es ácido, amargo y astringente. Sin embargo, durante el tostado la acidez del grano disminuye al reducirse la concentración de ácidos volátiles tales como el acético.⁴⁸ Se ha encontrado que durante el tostado la concentración de ácido acético disminuye aproximadamente el 70%, y que el aroma del cacao tostado no es dominado por la nota a vinagre. Inversamente, la concentración de ácidos no volátiles como son oxálico, cítrico, tartárico, succínico y láctico no es afectada por el proceso de tostado.⁴⁹ Durante el tostado, el cacao disminuye su humedad hasta el 2%, se hace más quebradizo y de color oscuro, además los aminoácidos y azúcares reductores interactúan en la reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático con la consecuente generación del aroma de origen térmico.

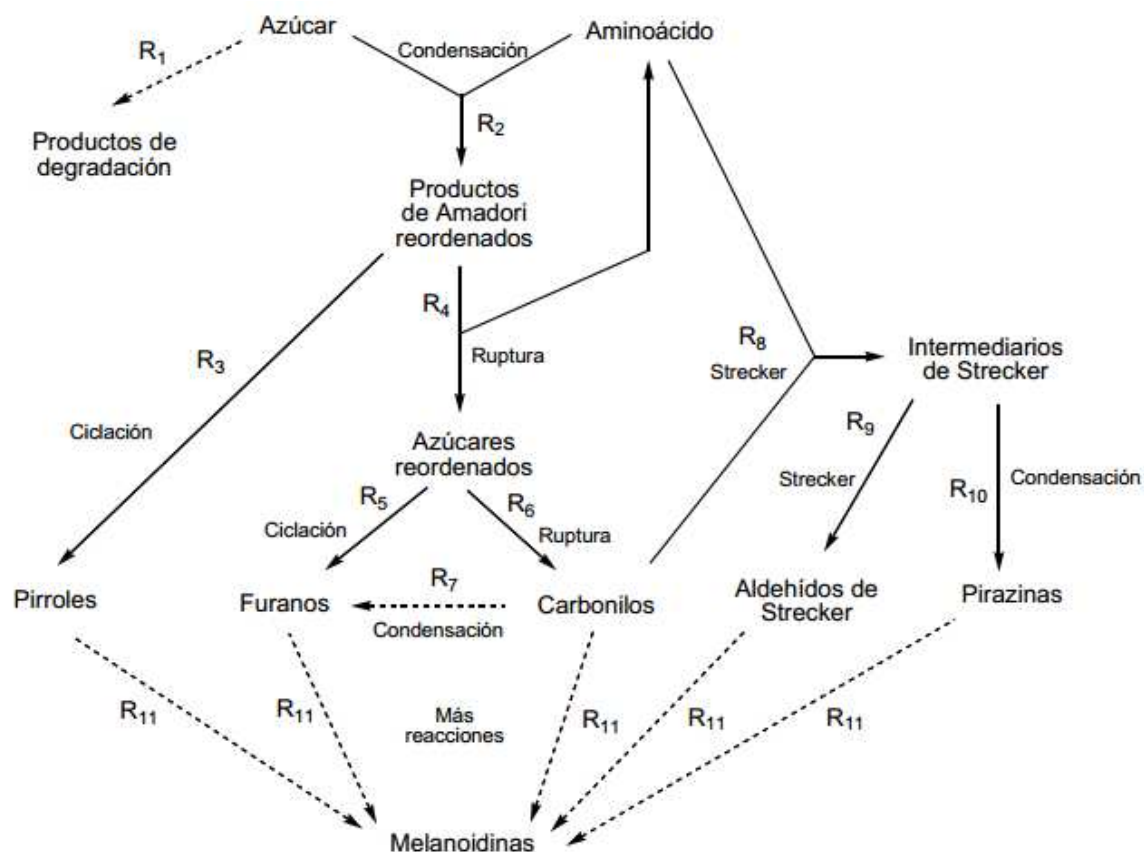
En la reacción de Maillard (Diagrama 2) los precursores del sabor generados en la fermentación y secado interactúan para producir compuestos volátiles como alcoholes, éteres, furanos, tiazoles, pirones, ésteres, aldehídos, iminas, aminas, oxazoles, pirazinas y pirroles, el esquema general de la reacción se puede apreciar en el diagrama 2. Los azúcares reductores son precursores del sabor carbonilo, principalmente formados a través de la hidrólisis de la sacarosa por acción de la invertasa y la hidrólisis enzimática de las antocianinas. La reacción comprende la condensación entre los compuestos carbonilos reductores como los azúcares reductores, aldehídos o cetonas; y compuestos con grupos amino libres, tales como aminas, aminoácidos, proteínas o cualquier compuesto nitrogenado.⁵⁰

48 BECKETT S. *The Science of Chocolate*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK. 2008.

49 FRAUENDORFER F, SCHIEBERLE P. Op Cit. p. 5523.

50 BIN HASNY M. Optimisation of cocoa bean roasting conditions based on the development of flavor compound. Thesis, faculty of applied science, university technology MARA. 2012. p. 27-28.

Diagrama 2. Vía general de la reacción de Maillard



Fuente: F. Jousse, T. Jongen, W. Agterof, S. Russell, P. Braat, Simplified kinetic scheme of flavor formation by the Maillard Reaction, J. Food Sci., 2002, 67, 2534-2542

- **Etapas de la reacción de Maillard.**

En el diagrama 3 se pueden observar las diferentes reacciones que se llevan a cabo en todo el proceso.

I. Etapa inicial: Productos sin color, sin absorción en el UV.

Reacción A: Condensación azúcar-amina.

Reacción B: Reordenamiento de Amadori.

Reacción H: Ruptura por radicales libres de los intermediarios de Maillard.

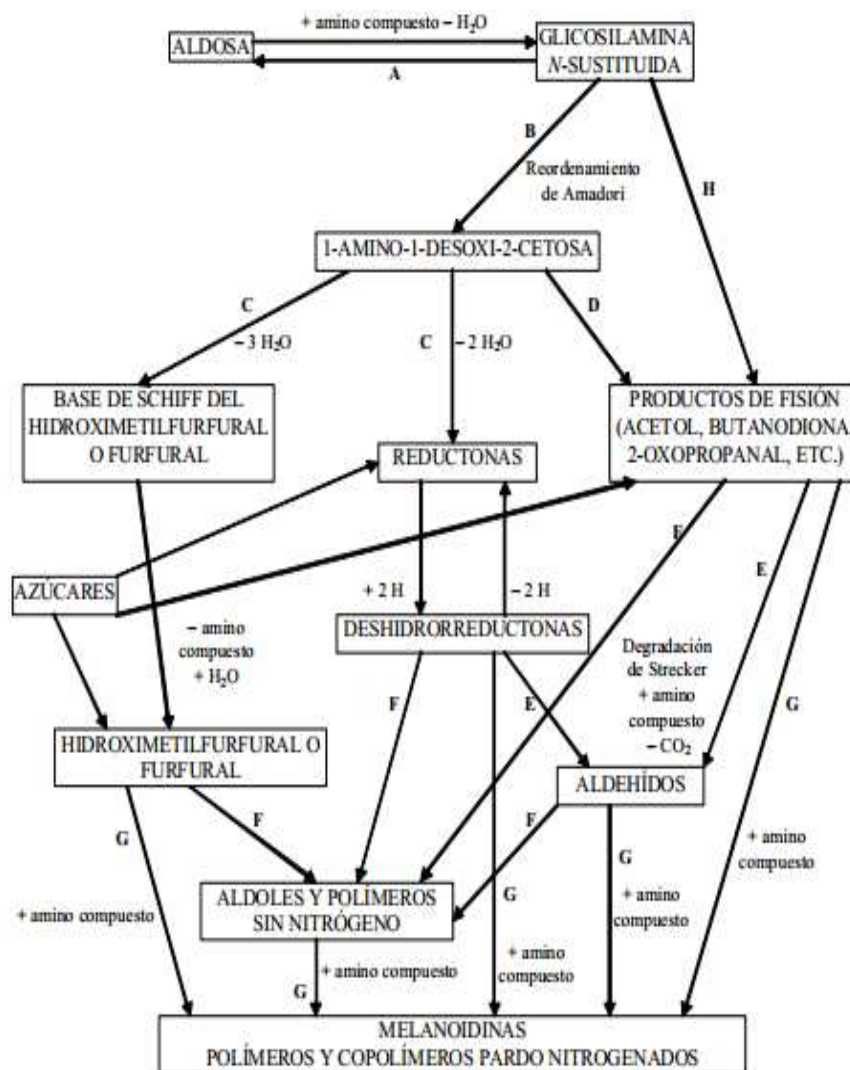
II. Etapa intermedia: Productos sin color o amarillos, con fuerte absorción en el UV. Reacción C: Deshidratación de azúcares.

Reacción D: Fragmentación de azúcares.

Reacción E: Degradación de aminoácidos (Degradación de Strecker).

III. Etapa final: Productos muy coloridos.
 Reacción F: Condensación aldólica.
 Reacción G: Condensación aldehído-amina y formación de compuestos heterocíclicos nitrogenados.⁵¹

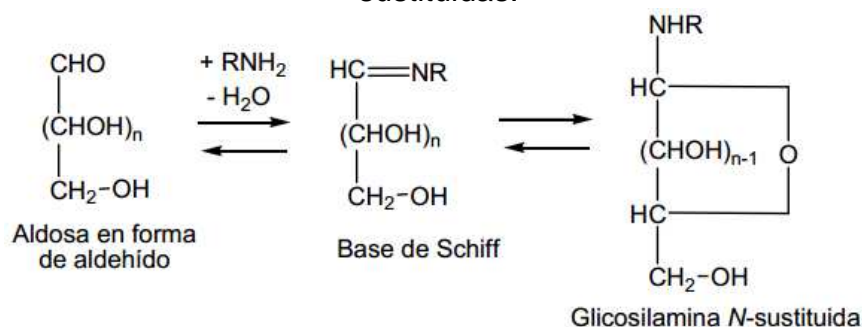
Diagrama 3. Etapas de la reacción de Maillard



Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

⁵¹ La reacción de Maillard. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

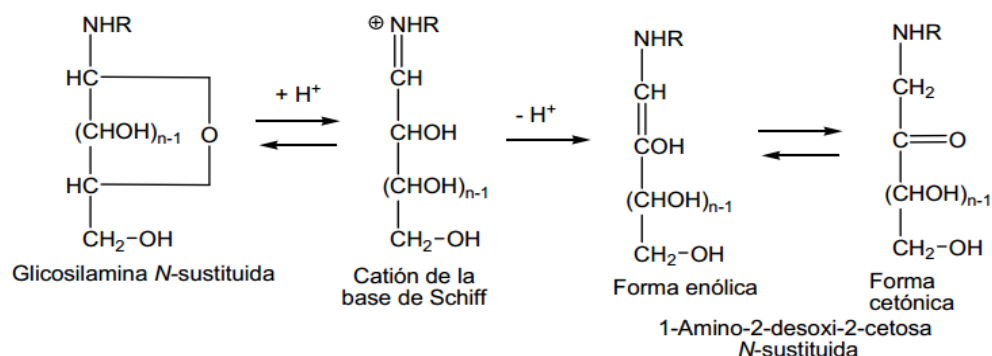
Reacción A: Condensación azúcar-amina. Formación de las N- glicosilaminas sustituidas.



Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

En la etapa temprana de la reacción de Maillard (Reaccion A), los azúcares reductores se condensan con un grupo amino libre de los aminoácidos o proteínas para dar un producto de condensación, N-glicosilamina sustituida, si la reducción se da con una cetosa el producto sufre un reordenamiento de Heyns y si el azúcar es una aldosa el reordenamiento es de Amadori.⁵²

Reacción B: Reordenamiento de Amadori para la obtención de las 1-amino- 2-desoxi-2-cetosas N-sustituidas.



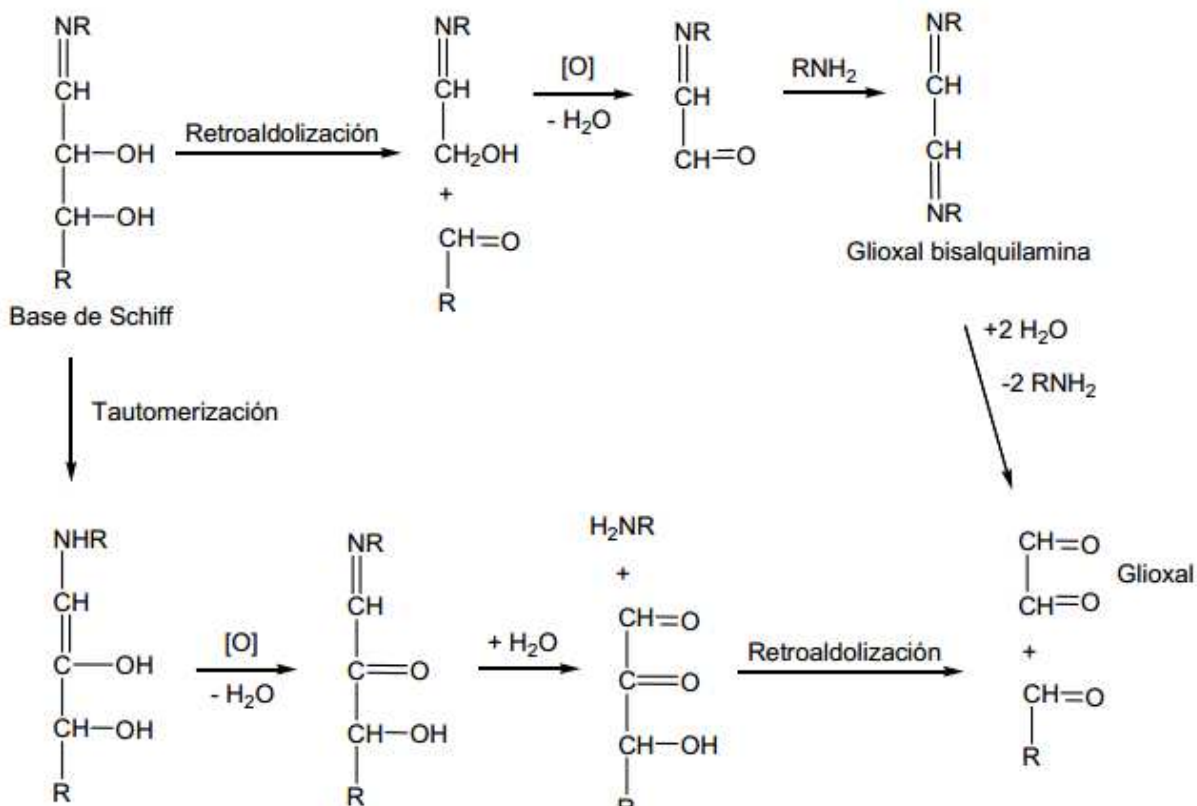
Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

La Reaccion B, es una reacción catalizada por ácido. Este reordenamiento no es reversible. Si reaccionan aldosas se forman 1-amino-2-desoxi-2-cetosas N-sustituidas, pero si son cetosas las que reaccionan se forman 2-amino-2-desoxialdosas N-sustituidas.⁵³

⁵² DIAZ S. PINOARGOTE M. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir del cacao CCN51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Guayaquil, Ecuador, 2012. Tesis de grado (ingenieros de alimentos). Escuela superior politécnica del litoral. Facultad en mecánica y ciencias de la producción. p. 26-28.

⁵³ NAMIKI M., HAYASHI T. Development of novel free radicals during amino-carbonyl reaction of sugar with amino acids, J. Agric. Food Chem., 1975, 23, p.487-491

Reacción H: Reacciones por radicales libres.

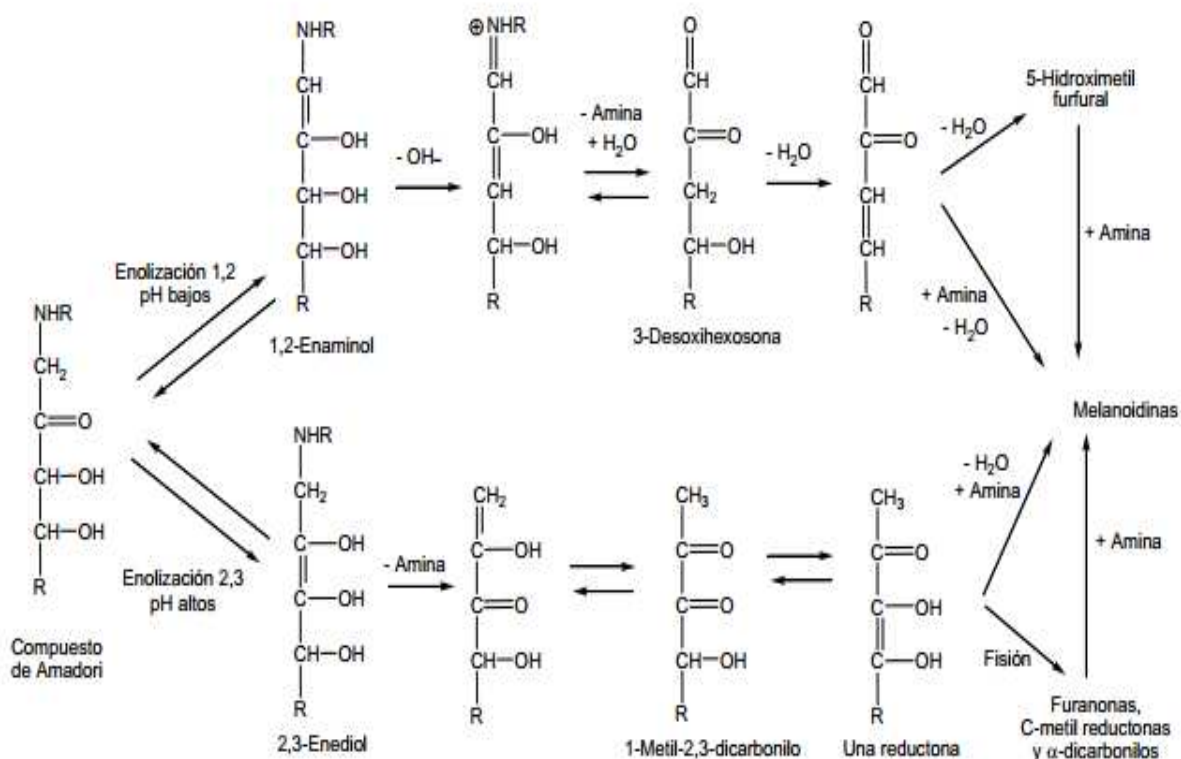


Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

En la reacción H se ha comprobado la presencia de radicales libres estables en la formación de melanoidinas. Se ha concluido que pueden ser el azúcar o la glicosilamina los compuestos de partida para esta reacción, con la formación de la base de Schiff y una oxidación subsecuente a la retroaldolización.⁵⁴

54 HOFMANN T. et al. Studies on radical intermediates in the early stage of the non-enzymatic browning of carbohydrates and primary amino acids, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, p.379-390.

Reacción C: Deshidratación de azúcares. Reacciones de Maillard, rutas principales de formación de melanoidinas a partir de los compuestos de Amadori.



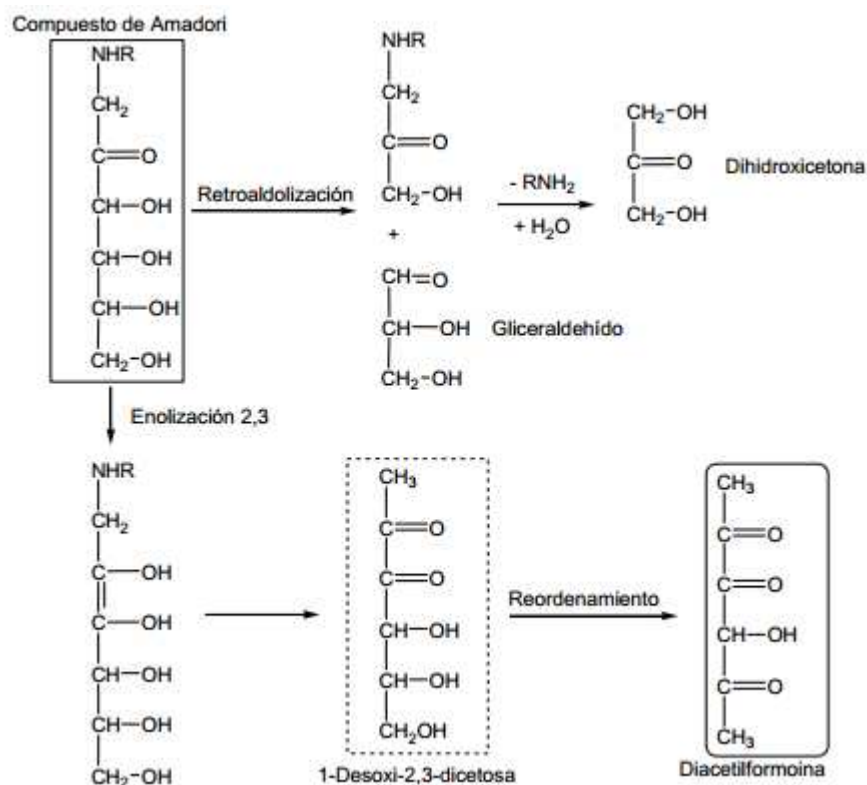
Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

La Reacción C ocurre por dos caminos. Bajo condiciones ácidas se forman furfurales, y en condiciones alcalinas se forman las reductonas.⁵⁵

Luego en la segunda etapa de la reacción ocurren las reacciones D, D1, D2, D3 y E que se presentan a continuación

⁵⁵ FEATHER M. S. Amine-assisted sugar dehydration reactions, in C. Eriksson (ed), Maillard Reactions in Food: Chemical, Physiological and Technological Aspects, Vol. 5, Pergamon Press, Oxford, 1981.

Reacción D: Fragmentación de azúcares

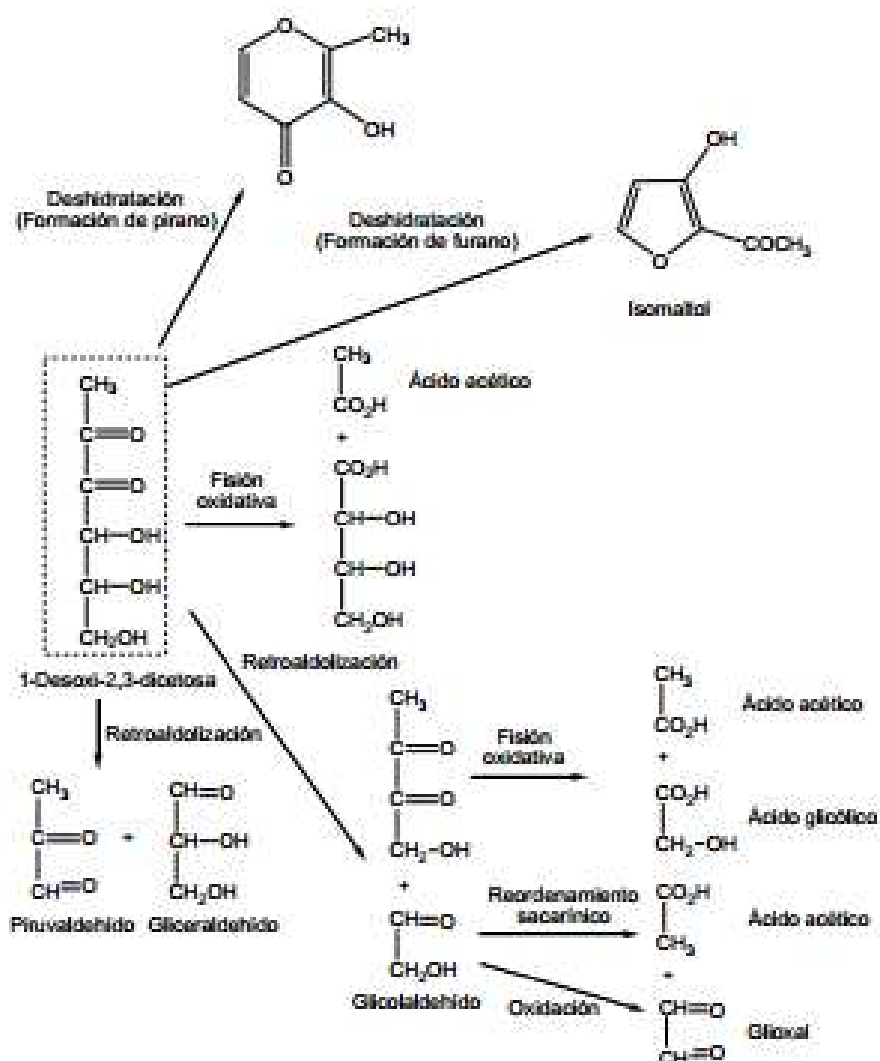


Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

El mecanismo por el cual ocurre principalmente una retroaldolización (Reacción D) y una fisión oxidativa. La fragmentación de las hexosas puede ser en C5/C1, C4/C2 o C3/C3.⁵⁶

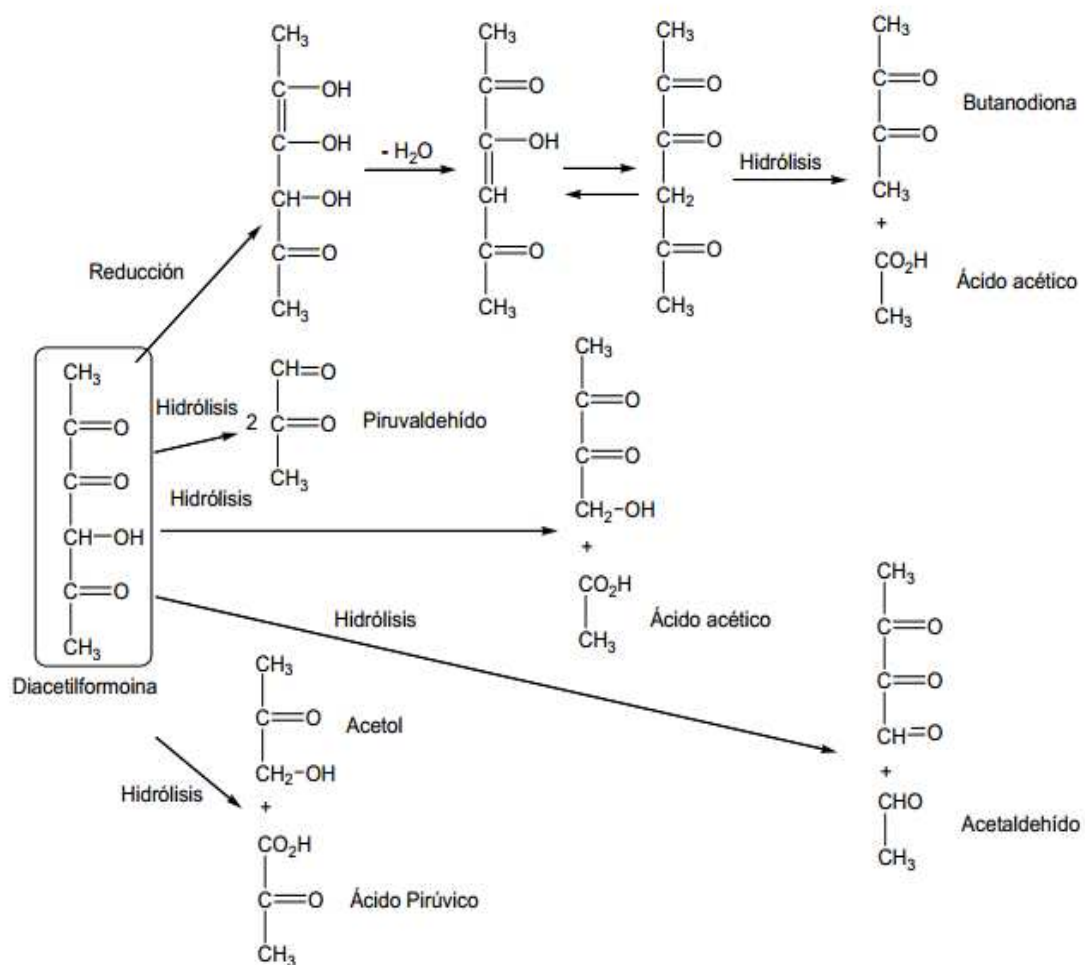
⁵⁶ WEENEN H., APELDOORN W. Carbohydrate cleavage in the Maillard reaction. In Flavour Science: Recent Developments, Vol. 197, A. J. Taylor and D. S. Mottram (eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996, 211-216

Reacción D₁: Productos de reacción de la 1-desoxi-2,3-dicetosa



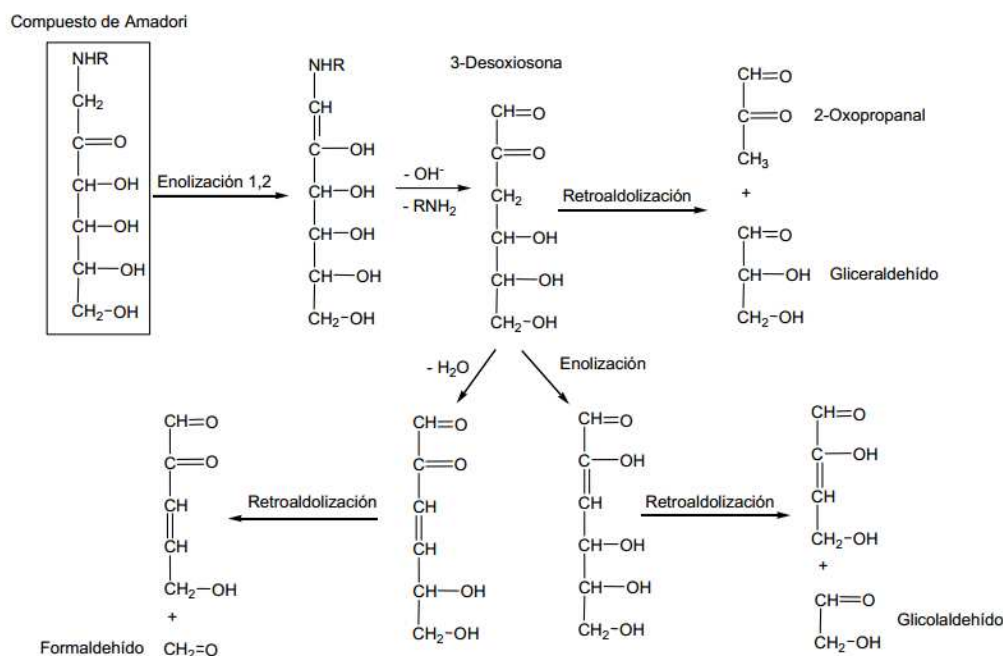
Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

Reacción D₂: Productos de reacción de la diacetilformoina.



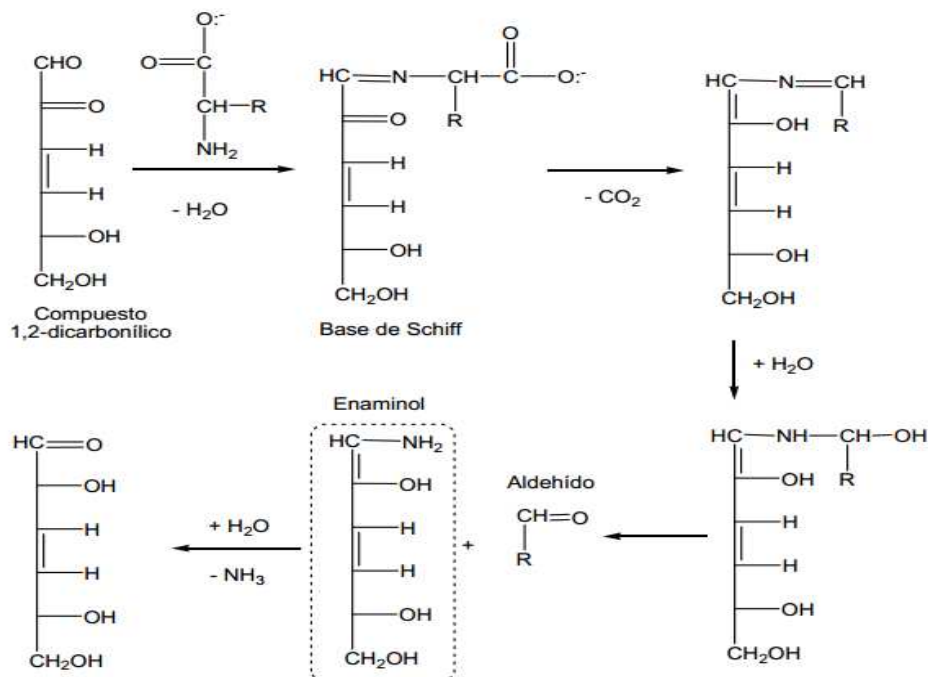
Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

Reacción D₃: Obtención de aldehídos



Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

Reacción E: Degradación de Strecker.



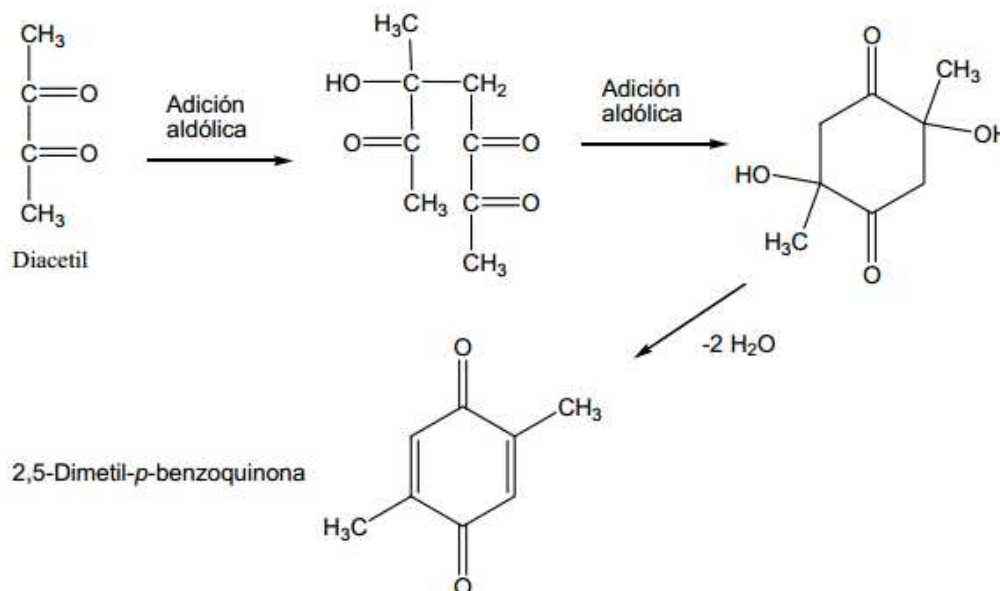
Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

Los compuestos dicarbonílicos de la reacción de Maillard reaccionan con el grupo α -amino de un aminoácido para formar una base de Schiff. La forma enólica es un α -aminoácido que se descarboxila con facilidad para dar un enamínol. El enamínol experimenta una autocondensación para formar un polímero café o bien una hidrólisis a la amina y al aldehído, correspondiendo el último al aminoácido original con un átomo de carbono menos. Los aldehídos que se forman por la degradación de Strecker constituyen muchos de los compuestos más importantes que tienen sabor en los alimentos.⁵⁷

Los aldehídos pueden originarse de las reacciones C, D y E, y pueden reaccionar entre ellos por una condensación aldólica. También pueden participar en esta reacción los compuestos carbonílicos derivados de la oxidación de lípidos. Las benzoquinonas pueden participar como componentes dicarbonílicos en la reacción de Strecker, formando iminas que pueden ser involucradas en la producción de melanoidinas.⁵⁸

Posteriormente se presentan las reacciones de la tercera etapa de la reacción, las reacciones F y G, a continuación, se presentan las reacciones en general

Reacción F: Condensación aldólica. Formación de quinonas a partir de productos de fragmentación de los azúcares.

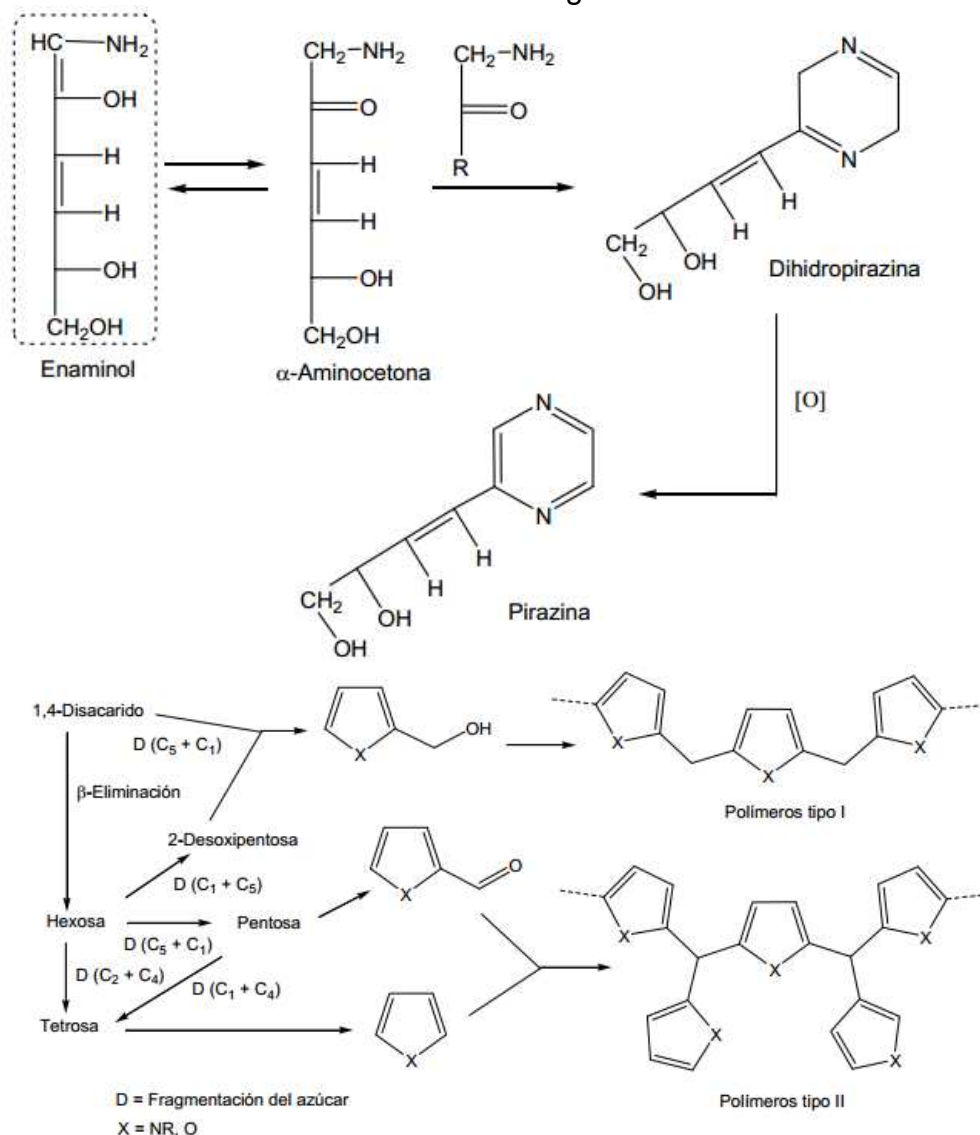


Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

57 RIZZI G. The Strecker degradation and its contribution to food flavor, in Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress, R. Teranishi, E. L. Wick, I. Hornstein (eds), Kluwer/Plenum, New York, 199, 335-343

58 MOTTRAM D., LESEINEUR A. The effect of pH on the formation of aroma volatiles in meat-like Maillard systems, in Flavor Science and Technology, Y. Bessière and A. F. Thomas (eds), Wiley, Chichester, 1990, 121-124

Reacción G: Condensación aldehído-amina. Formación de compuestos heterocíclicos nitrogenados.



Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

Los aldehídos, y en particular los α,β -insaturados, reaccionan con aminas para dar polímeros de alta masa molecular, que son productos coloridos de estructura desconocida (melanoidinas). Se han encontrado sistemas heterocíclicos como piridinas, pirazinas, pirroles e imidazoles en las melanoidinas. La constitución de las melanoidinas depende de cómo hayan sido producidas.⁵⁹

59 KATO H., HAYASE F. An approach to estimate the chemical structure of melanoidins, in S. Horiuchi, N. Taniguchi, F. Hayese, T. Kurata, T. Osawa (eds), the Maillard Reaction in Food Chemistry and Medical Science: Update for the Postgenomic Era, Vol. 1245, Elsevier, Amsterdam, 2002.

Como se observa en todas las reacciones analizadas anteriormente, el desarrollo del aroma de origen térmico es un fenómeno complejo que está en función de la relación de las condiciones de tiempo-temperatura y de la composición química del grano. Las condiciones de tostado tiempo-temperatura pueden variar entre periodos de 5 a 20 min por intervalos de temperatura de 90 a 150 °C. Para la selección de las condiciones de tostado se deben considerar diferentes factores como son el tipo de cacao, su origen, tratamiento post-cosecha y el grado de tostado deseado.⁶⁰

- **Comportamiento de los compuestos volátiles durante el tostado**

El aroma del cacao tostado es producido como resultado de la combinación de 400-500 compuestos volátiles. Éstos pertenecen principalmente a las familias de las pirazinas, aldehídos, éteres, tiazoles, fenoles, cetonas, alcoholes, furanos y ésteres. Las pirazinas y aldehídos son los compuestos que se forman en mayor cantidad durante el tostado del cacao.⁶¹

Estos compuestos se forman durante el proceso de tostado, específicamente en la degradación de Strecker (vía la reacción de Maillard), que consiste en la reacción de un aminoácido con un dicarbonilo, para la formación de aminocetona. Éstas por su parte se condensan para formar pirazinas y otros compuestos heterocíclicos. En la reacción H se muestra la producción de dos aldehídos, el furfural que genera notas agradables de almendra, amaderado y dulce, y el pirrol-2-carbaldehído N-sustituido que genera aromas de nuez asada.⁶²

En las reacciones I se presentan diferentes reacciones que involucran la formación de diferentes pirazinas, los cuales son compuestos heterocíclicos aromáticos, y en general forma un grupo de sustancias muy importantes relacionadas con el aroma, en el cacao son los principales responsables del aroma característico su presencia se relaciona con notas aromáticas a chocolate, tostado, nuez y madera,⁶³ entre las más importantes se encuentran la trimetil pirazina, tetrametil pirazina y 2-acetil pirazina.⁶⁴

60 NAZARUDDIN R, HASSAN O, SAID M, SAMSUDIN W, IDRIS NA. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation* 30: 280-298. 2005.

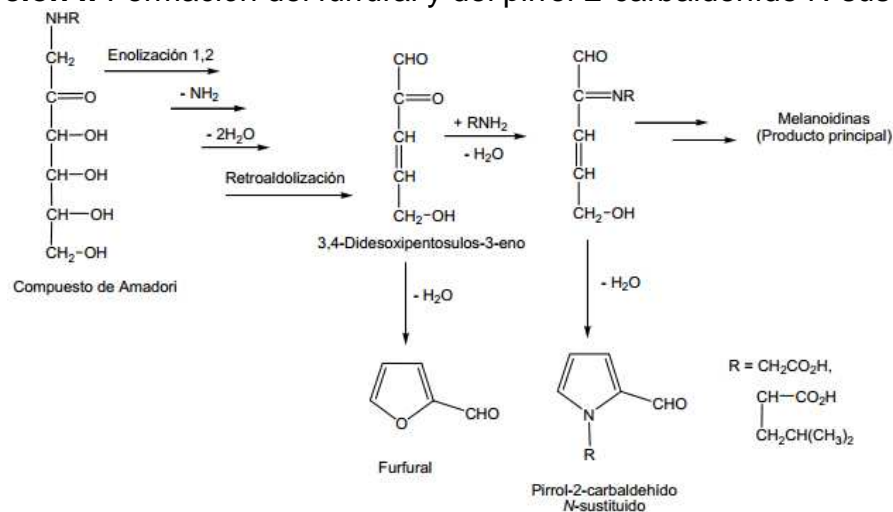
61 NAZARUDDIN R. Ibid.

62 Características organolépticas. Base de datos en línea. [Citado agosto 2016]. Disponible en: <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1028161.html>

63 FRAUENDORFER F, SCHIEBERLE P. Op Cit.

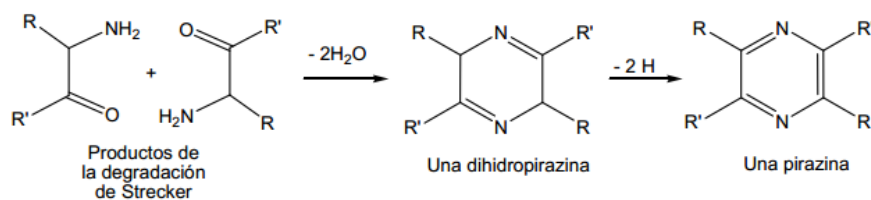
64 ALVARADO M. et al. Sustancias aromáticas en el cacao cosechado en la zona de río Anis, municipio Sucre, estado Portuguesa, Venezuela. 2014.

Reacción I: Formación del furfural y del pirrol-2-carbaldehído N-sustituido



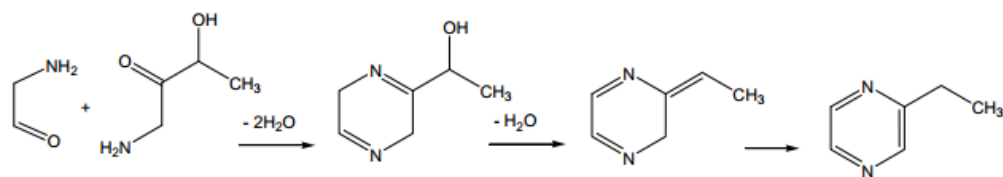
Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

Reacción J: Formación de pirazinas a partir de derivados 1,2-aminocarbonílicos obtenidos en la degradación de Strecker.



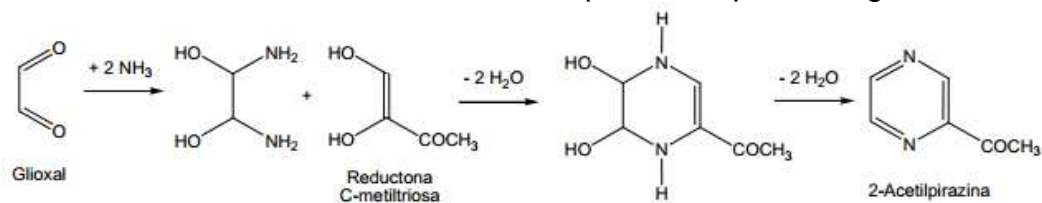
Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

Reacción K: Formación de la etilpirazina.



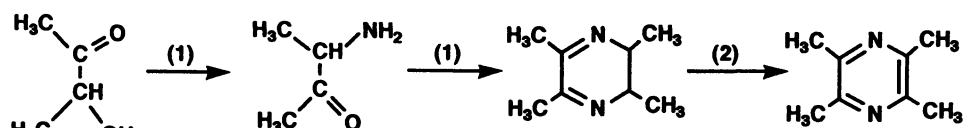
Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

Reacción L: Formación de la 2-acetilpirazina a partir del glioxal.



Fuente: La reacción de Maillard. UNAM. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

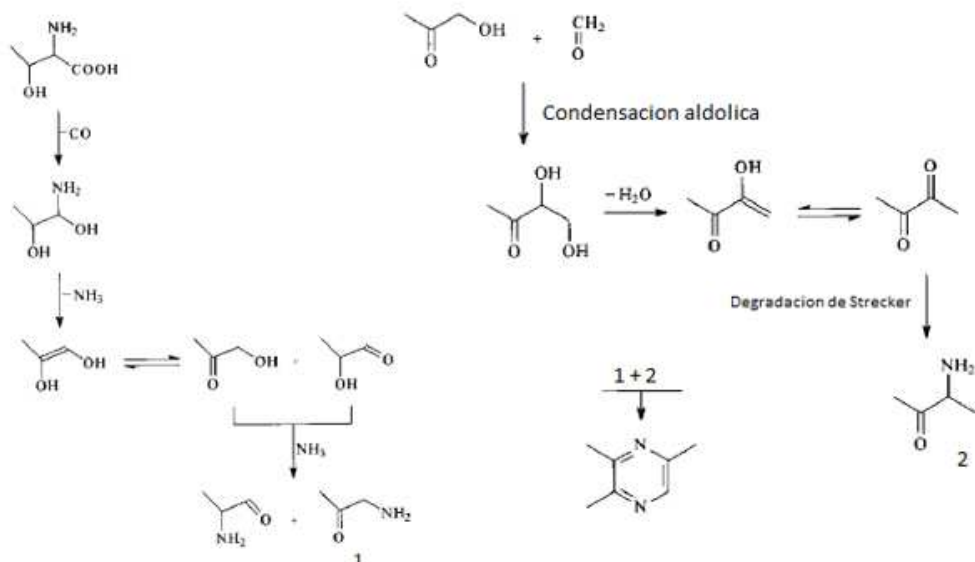
Reacción M: Formación de la tetrametil pirazina.



Fuente: HUAN T. et al. Kinetics of Tetramethylpyrazine Formation under High Hydrostatic Pressure.

- (1) Formación de la base de Shift
- (2) Deshidrogenación

Reacción N: Formación de la trimetil pirazina



Fuente: CHI-KUEN Shu. Pyrazine formation from serine and treonine. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 4332-4335.

En el grupo de compuestos identificados como mayoritarios, se encuentran dos alcoholes: el linalol y el 2-heptanol, éstos le proporcionan al cacao tostado notas florales y herbales. Estos compuestos odoríferos son producidos por la degradación térmica de aminoácidos y por la reducción de aldehídos y cetonas.⁶⁵

El grupo funcional de los ésteres es uno de los grupos más importantes en el cacao tostado. Éstos presentan las mayores unidades de área (concentración) a temperaturas altas (160-170 °C) con tiempos cortos (5-15 min) de tostado. Los ésteres se correlacionan con las notas frutales del cacao tostado.⁶⁶

65 SERRA-BONVEHÍ J. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology* 221: p.19-29.2005.

66 JINAP S. et. al. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during in broasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science of FoodAgriculture* 77: p. 441-448. 1998.

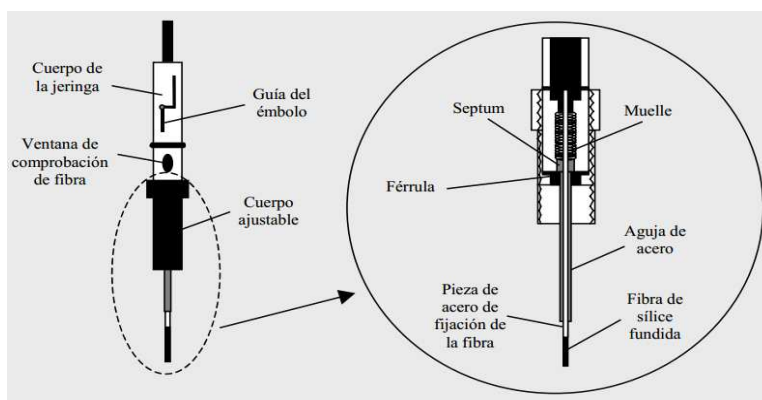
Durante todas esas etapas, se busca obtener la mayor cantidad y concentración de compuestos volátiles deseables como son: pirazinas, aldehídos, ésteres y alcoholes principalmente. Con una menor cantidad de compuestos no deseables como son ácidos de cadena corta y fenoles.⁶⁷

2.2.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

2.2.3.1 Micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME)

En los últimos años se ha implementado una nueva técnica para la preparación de muestras, ésta no emplea disolventes orgánicos y no requiere tiempos largos de extracción, es la micro extracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) desarrollada a principios de los años 90 por el grupo de investigación de J. Pawliszyn.⁶⁸ Posteriormente, la compañía Supelco comercializó en 1993 el sistema SPME basado en una microjeringa reutilizable. Las primeras fibras desarrolladas fueron recubiertas con Polidimetilsiloxano (PDMS) y Poliacrilato (PA), polímeros utilizados para la extracción. La naturaleza química de los analitos determina el tipo de polímero utilizado en la extracción. No obstante, la selección del recubrimiento se basa principalmente en la polaridad y en la volatilidad de los compuestos.⁶⁹ Hoy, el sistema manual de SPME, es un soporte semejante a una jeringa modificada (HOLDER) donde se aloja la pequeña fibra de sílice fundida (Figura 1).

Figura 1. Dispositivo de Microextracción en fase sólida (SPME).



Fuente: PEÑALVER M. *Aplicación de la micro extracción en fase sólida al análisis medioambiental*. Director: Rosa Marce y Eva Pocurull. Tesis doctorado. Universidad Rovira I Virgili, departamento de Química Analítica y Orgánica, Área de Química Analítica. Tarragona, p.11. 2002.

67 ROJAS-MONROY G. Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Tesis de Maestría, Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico, 2005.

68 PAWLISZYN, J. *Applications of Solid Phase Microextraction*. Ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK, p. 655.1999.

69 DELGADO B. "Compuestos carbonílicos en muestras de interés medioambiental y agroalimentario. Capítulo IV: Determinación de compuestos carbonílicos mediante SPME-HPLC." Ciencias y Tecnologías 7. p.230. 2009.

Existen básicamente tres formas de extracción en SPME: Extracción directa, extracción en el espacio de cabeza o head-space y extracción con fibras protegidas con membranas. En la primera forma, se introduce la fibra directamente en la muestra ocurriendo una relación entre la cantidad de analíto absorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra. En la segunda los analítos son extraídos de la fase de vapor equilibrada en la muestra, por lo cual estos analítos necesitan ser transportados a la fracción volátil antes de ser absorbidos por la fibra. En este tipo de extracción los analítos volátiles se extraen más rápido que los semi-volátiles dado que los primeros se encuentran en una concentración más alta en el head-space que contribuye a tasas masivas más rápidas de transporte en dicho espacio y permite proteger la fibra de compuestos de elevado peso molecular, modificar la matriz de la muestra, como por ejemplo variando el pH, sin dañar la fibra. Mediante el último método, se persigue proteger la fibra con una membrana se establece una barrera que impide algún tipo de daño a la fibra. Esta membrana es ventajosa para la determinación de analítos que tienen volatilidades demasiado bajas para usar el espacio en cabeza, con lo cual la fibra ha de ponerse en contacto directo con la muestra. Además, el material de la membrana puede añadir un cierto grado de selectividad al proceso de extracción.⁷⁰

En general, los tiempos de equilibrio para compuestos volátiles son más cortos en head-space que en el de inmersión directa, debido principalmente a tres razones: a) una gran fracción de los analítos están presentes en la fase de vapor antes del comienzo de la extracción, b) existe normalmente una gran interface entre la matriz de la muestra y el espacio de cabeza, y c) los coeficientes de difusión en la fase gas son generalmente más altos que en una líquida. Por último, es importante porque su resultado en cuanto a la composición de la muestra en estudio representa de mejor forma el aroma percibido por el hombre.⁷¹

Existen varios estudios realizados que involucran al cacao con la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME); por ejemplo, se ha llevado a cabo un estudio de los compuestos volátiles del cacao variedad forastero, durante los procesos de fermentación, secado y tostado. Mediante la aplicación de análisis de los componentes principales (PCA) y usando perfiles cromatográficos obtenidos por SPME en la etapa de tostado se lograron aislar 70 compuestos volátiles.⁷²

⁷⁰ Ibid. p.228-229.

⁷¹ SANZ C. ANSORENA D. BELLOJ. y CID C. *Optimization Head Space Temperature and Time Sampling for Identification of Volatile Compounds in Ground Roasted Arabica Coffee*. 49: p. 223. 2001

⁷² RODRÍGUEZ J. "Estudio de los compuestos volátiles de *Theobroma cacao* L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado". Director: María Eugenia Jaramillo Flores y Eugenia del Carmen Lugo Cervantes. Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional De Ciencias Biológicas, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. México, D.F., junio de 2011.

- **Condiciones De Extracción.**

La micro extracción en fase sólida acoplada a espectrometría de masas (SPME-GC/MS), requiere una serie de condiciones para realizar una mejor extracción, tales como:

Tipo de fibra: La selección de la fibra se basa en la absorción de analitos por ella y en la evaluación del tipo de fase estacionaria contenida en cada fibra. Las fibras de PDMS, que es un polímero líquido, son las más utilizadas ya que fueron las primeras fibras introducidas para SPME. Estas fibras son las más adecuadas para los analitos apolares, aunque en algunos casos, también pueden ser usadas para la determinación de analitos con cierta polaridad.⁷³ La afinidad de los analitos por el PDMS puede ser estimada a partir de los tiempos de retención de los compuestos en las columnas de PDMS ya que el polímero que compone las fibras de PDMS y estas columnas capilares es básicamente el mismo. En general, se recomienda utilizar las fibras de mayor espesor, como la de 100µm, para compuestos con coeficientes de partición bajos y de poco espesor para los que presenten coeficientes de partición elevados.⁷⁴

Temperatura de extracción: estudios muestran que existe mayor cantidad de compuestos volátiles en las muestras que son sometidas a calentamiento que aquellas que no se han calentado. A temperatura ambiente, no todos los compuestos son absorbidos por la fibra. Se ha estipulado que para la extracción de analitos por HS-SPME: “un aumento en la temperatura de extracción, ayuda a una rápida extracción y conduce a un aumento en la concentración de los analitos”.⁷⁵

Tiempo de extracción: Se selecciona el tiempo de extracción requerido para llegar al estado de equilibrio entre la fibra y los compuestos volátiles de la muestra. Se han estudiado diferentes tiempos de extracción (10, 30, 60 y 90 min). El aumento de los compuestos volátiles se da a medida que transcurre el tiempo de exposición. El equilibrio se ha alcanzado a los 60 min, en tiempos superiores se ha evidenciado una disminución en cuanto a su abundancia.⁷⁶ COSTA reporta que después de que la fibra alcanza el equilibrio la cantidad de extractos empieza a disminuir. La razón de este comportamiento se sugirió que los compuestos son liberados por la fibra luego de su equilibrio.⁷⁷

73 GRANDA F. VALENCIA S. MARÍN J. M. RESTREPO G. *Optimización Del Método De Microextracción En Fase Sólida Acoplada A Cromatografía Gaseosa Para Análisis De Metanol En Agua*. Revista Colombiana de Química, vol. 40, núm. 2, p.201-210. Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia.2011.

74 PAWLISZYN J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practic*. Wiley-VCH Inc.: New York, p. 248.1997

75 Ibid., p.250

76 ROJAS G. ME. Op. cit., p. 48

77 COSTA F. PARREIRA C. *Comparison of Two SPME Fibers for Differentiation of Coffee by Analysis of Volatile Compounds*. Chromatographia.

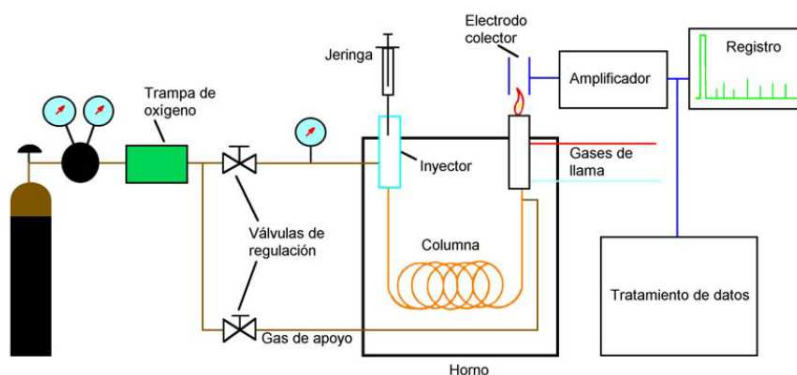
2.2.4 Técnicas instrumentales de análisis

Los avances tecnológicos en el campo del análisis instrumental han permitido investigar a fondo los compuestos responsables del aroma y determinar el complejo perfil aromático de diferentes sustancias. Se distinguen dos técnicas muy importantes empleadas en el análisis de compuestos volátiles que son la cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC y MS); las cuales cada día toman mayor importancia en este campo.

2.2.4.1 Cromatografía de gases (GC).

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte (Nitrógeno, Helio o Hidrógeno), y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de muestra en la corriente del gas inerte a elevada temperatura; en la columna se separarán los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de adsorción (cromatografía gas -sólido). Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de algún sistema de detección adecuado, o bien serán dirigidos hacia un dispositivo de recogida de muestras. Los componentes de la mezcla se separan de acuerdo a sus afinidades con la fase estacionaria.⁷⁸

Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de gases.



Fuente: HOFFMAN A. "Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas GC/MS". [Citado agosto 2014] Disponible en internet: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21937/Capitulo5.pdf>. p.46.

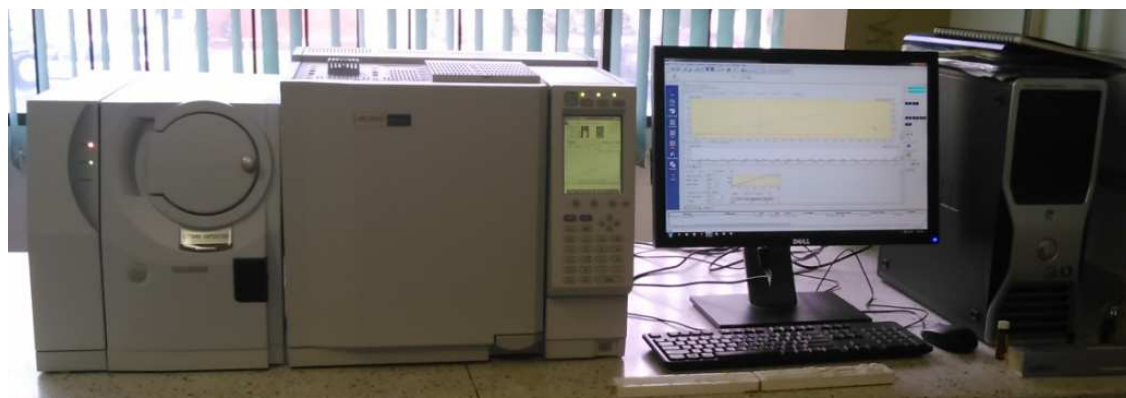
⁷⁸ HOFFMAN A. "Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas GC/MS". [Citado agosto 2014] Disponible en internet: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21937/Capitulo5.pdf>. p.46.

2.2.4.2 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS).

La CG es la principal técnica analítica para la separación de compuestos volátiles, por su rápido análisis, resolución, fácil operación y excelentes resultados cuantitativos. Desafortunadamente la GC no puede confirmar la identidad o estructura de una muestra. El propósito básico de la espectrometría de masas es convertir la muestra en productos que son indicativos de la molécula original. Los productos formados son iones positivos gaseosos, cuya masa y abundancias relativas son mostradas en el espectro de masa. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una técnica que se basa en la separación de compuestos volátiles teniendo en cuenta sus puntos de ebullición. Al llegar al detector, las moléculas del analito son bombardeadas por electrones, rompiendo enlaces (en ocasiones no necesariamente) y formando fragmentos más estables.⁷⁹

El adecuado manejo de los equipos a través del software y de los datos obtenidos durante el análisis instrumental, permite una completa y apropiada interpretación de los resultados, disminuyendo así el tiempo que se invertiría en el procesamiento manual de los mismos y facilitando la implementación de las Buenas Practicas de Laboratorio (GLP por sus siglas en inglés).⁸⁰

Imagen 11. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas



Fuente: Equipo de la Universidad de Nariño. Laboratorios Especializados. Laboratorio de Cromatografía

79 LÓPEZ VALENCIA J.P., "Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metil ésteres de ácidos". Director: Juan Pablo Arrubla. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología, Programa de tecnología química. Pereira. 2008

80 STASHENKO, E. *Acoplamiento GC-MS: sistemas de datos (Software)*. [Citado agosto 2014] Universidad Industrial de Santander. Laboratorio de Cromatografía. Escuela de Química. Disponible en Internet: <http://cromatografia.uis.edu.co/cursos>

- **Correlación entre GC-MS e índices de retención de Kovat's (I_k)**

Para la identificación de los compuestos separados por cromatografía de gases mediante la espectrometría de masas, los tiempos de retención y los espectros, algunas veces no proporcionan información suficiente para asegurar una identificación positiva, en el caso de mezclas complejas como los compuestos volátiles. Una aproximación adicional consiste en combinar la especificidad y/o reproducibilidad de los índices de retención con los patrones de fragmentación obtenidos por Espectrometría de masas, para el componente correspondiente al tiempo de retención considerado.⁸¹

Los I_k indican el orden de aparición de los compuestos respecto a parafinas lineales, su determinación se hace dependiendo de las condiciones de temperatura a las que se haya realizado el análisis de la muestra. Sin embargo, las más comunes son las condiciones de temperatura programada, en donde los tiempos de retención de una serie homóloga aumentan en forma lineal con el número de carbonos.⁸²

81 A. P. *Cromatografía gaseosa*, p.18. [Citado agosto 2014] disponible en Internet: www.bilbo.edu.uy/~planta/pdf/GC.doc.

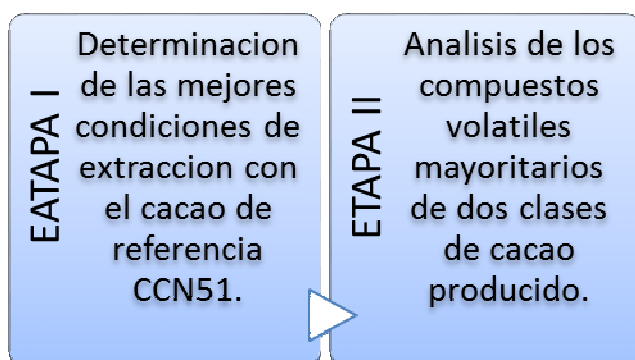
82 ÁLVAREZ A. *Aislamiento, purificación e identificación de los principios tóxicos alcaloídicos en plantas del género crotalaria y alimento contaminado para aves*. UIS. Bucaramanga, p. 135. 2004.

3. METODOLOGIA

3.1 Plan experimental.

Para el desarrollo de todos los objetivos planteados, la estrategia experimental que se siguió fue dividida en dos etapas. En la etapa I se determinó las mejores condiciones para la extracción de los compuestos volátiles mediante la técnica de micro extracción en fase solida (HS-SPME), para ello se empleó una variedad de cacao reconocida comercialmente con la referencia CCN51. Posteriormente, en la etapa II se evaluó los perfiles de los componentes volátiles mayoritarios de dos clases de cacao producidos y comercializados por la asociación CORTEPAZ, este cacao es reconocido como regional, los cuales presentaron variaciones en los tiempos de fermentación.

Diagrama 4. Etapas experimentales.



3.1.1 Materia prima.

Para la primera etapa se utilizó cacao de referencia CCN51 (clon) fermentado por 9 días, ya que se trata de un cacao ampliamente estudiado y comercializado por lo cual puede considerarse como un material de referencia no certificado. Para la segunda etapa se empleó el cacao regional con dos tiempos diferentes de fermentación (5 y 6 días), de esta manera se logró comparar el cacao de referencia CCN51 con el cacao regional considerado fino de aroma y el efecto de los tiempos de fermentación. Las tres muestras de cacao fueron obtenidas de la asociación CORTEPAZ, ubicada en la vereda San Luis Robles del municipio de Tumaco.

Imagen 12. Localización del municipio de Tumaco en el departamento de Nariño



Fuente: Google maps

Las actividades de cosecha de las mazorcas de cacao y la posterior obtención de los granos de cacao se realizaron por métodos tradicionales según las costumbres de producción y post cosecha que la asociación CORTEPAZ tiene implementadas. La fermentación y secado del grano de cacao CCN51 se llevó a cabo en el beneficiadero de la asociación. El cacao fresco o en baba se sometió a un proceso de fermentación espontánea. El proceso se realizó en cajas de madera y tuvo una duración de 9 días. El proceso de aireación, secado al sol y el tostado se realizó de acuerdo al protocolo establecido para la preparación de licor de cacao comercial fino y de aroma.

Para evaluar el perfil de los compuestos volátiles del cacao regional, se realizó un experimento variando los tiempos de fermentación, una muestra se sometió a 5 días y la otra a 6 días de fermentación. Estas muestras tuvieron las mismas condiciones de secado y tostado que el clon CCN51.

Todas las muestras de cacao se sometieron a microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) para determinar las condiciones óptimas y análisis por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para obtener el perfil cromatográfico de compuestos volátiles (identificación de compuestos mayoritarios). Los resultados de la optimización y comparación de los compuestos volátiles obtenidos se

analizaron por métodos quimiométricos, mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI. II.

3.2 Material general de laboratorio

- Balanza: Balanza analítica Ohaus
- Agitadores: agitadores magnéticos Agimatic-N (P-Selecta)
- Plancha de calentamiento: plancha de calentamiento Corning PC420D
- Equipo de extracción: fibras de SPME Supelco, referencia: DVB-CAR/PDMS 30µm, CAR/PDMS 75µm y PDMS/DVB 65µm, instaladas en un holder Supelco.
- Equipos de análisis: cromatógrafo de gases ShimadzuGC-17A, con un detector de ionización en llama (FID) - cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (GC-MS) Shimadzu QP2010S.

3.3 Métodos de análisis

3.3.1 Ajuste de las variables de extracción de los compuestos volátiles

Para la determinación de las condiciones óptimas de extracción se empleó una muestra de cacao CCN51 y se desarrolló un procedimiento para detectar los analitos por medio de HS-SPME acoplada a cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID) según la metodología reportada por MILLARES⁸³, para lo cual se realizó la optimización de las condiciones experimentales mediante la aplicación de un diseño experimental tipo factorial usando la metodología de superficie de respuesta. Los factores fueron: tipo de fibra, temperatura y tiempo de extracción. El objetivo del diseño experimental fue maximizar la extracción de los compuestos volátiles de la muestra.

Se tomó 4g de muestra de cacao CCN51 tostado y molido, se llevó a un vial con septa de goma de cierre hermético.

Se acondicionó las tres fibras de SPME previamente instaladas en el holder según los parámetros recomendados por el fabricante en el inyector del cromatógrafo de gases, una vez la fibra estaba lista se perforó la septa de goma y se llevó a un sistema de calentamiento el cual constó de una plancha de calentamiento y agitación constante para cada extracción, el montaje se detalla en la imagen 13. Las especificaciones de extracción y el diseño estadístico se indican en la tabla 1.

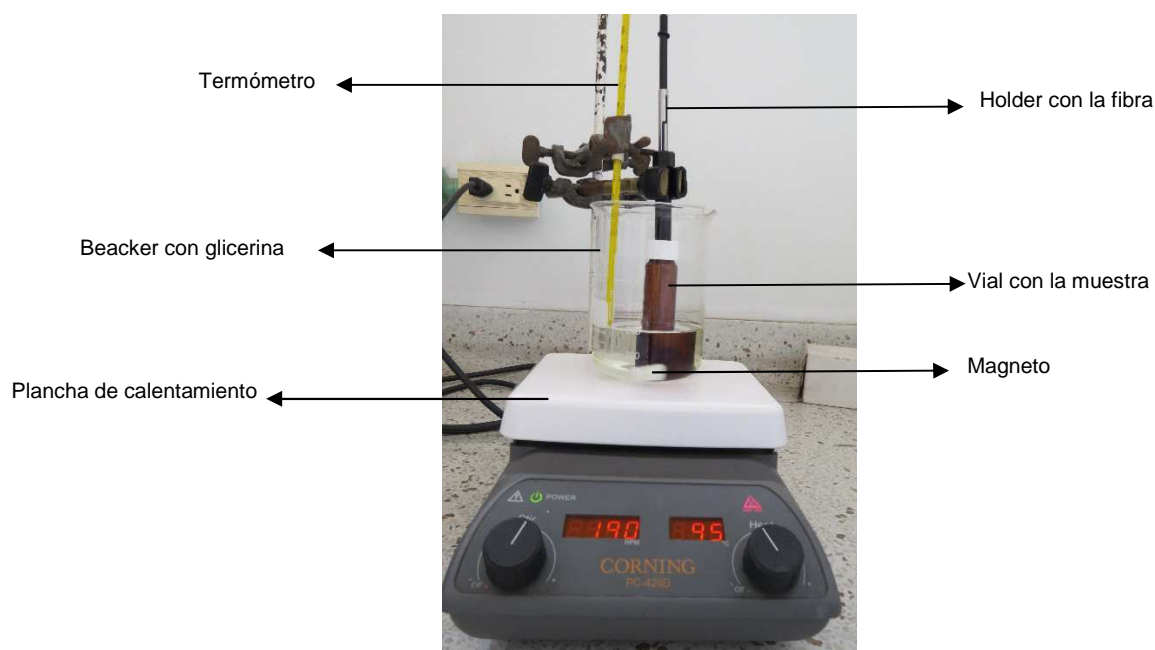
83 MIRALLES-GARCIA J. Chemical Composition and Flavour- Development of Cocoa Products by Thermal and Enzymatic Technologies. Thesis Ph. D. University of Salford, A Greater Manchester University, School of Environment and Life Sciences. 2008.

Tabla 1. Especificaciones de extracción técnica HS-SPME.

| | | |
|-------------------------|---|--|
| Clase de diseño | Superficie de respuesta | Factorial completa de 3 factores a 3 niveles |
| Número de ensayos | $3^3 = 27$. Por duplicado = 54 aleatorizados | |
| Factores experimentales | Temperatura Tiempo Fibra | 3 niveles (25, 40 y 60°C) 3 niveles (15, 30 y 60 minutos) 3 niveles (Fibras: DVB/CAR-PDMS, CAR/PDMS, DVB/PDMS) |
| Variables de respuesta | Número de COVs | |

Fuente: esta investigación

Imagen 13. Montaje de la técnica Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME)



Fuente: Esta investigación.

En todas las combinaciones de tiempo-temperatura se consideraron 15 minutos como condición de pre-equilibrio según los reportes encontrados en el trabajo de RODRIGUEZ.⁸⁴

⁸⁴ RODRIGUEZ CAMPOS J. "Estudio de los compuestos volátiles de Theobroma cacao L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado". Tesis de doctorado en alimentos. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional De Ciencias Biológicas, México, D.F., p. 55. junio de 2011.

Para esta fase, el análisis de la cantidad de compuestos volátiles presentes en la muestra de ensayo de cacao CCN51, según las variables estudiadas, se empleó la técnica Cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID) con las siguientes condiciones: Un equipo Shimadzu GC-17A (Imagen 14), con un detector de ionización en llama (FID). Columna ZB-5MS (Phenomenex de 30m x 0,25mm, diámetro interno 0,25µm). El gas de arrastre fue helio a razón de 1,0 mL/min, la temperatura del inyector 250°C y del detector 280°C. La fibra para cada muestra se introdujo en el inyector del GC para desorción de los volátiles durante 2 min en el modo de *splitless*. La programación de temperatura fue de 40°C durante 2 min, luego se incrementó a razón de 10 °C/min hasta 280°C y se mantuvo a esta última durante 5min hasta terminar la separación.⁸⁵

Imagen 14. Cromatógrafo de gases



Fuente: Equipo de la Universidad de Nariño. Laboratorios Especializados. Laboratorio de Cromatografía

3.3.2 Separación e identificación de los compuestos volátiles mayoritarios

Una vez determinadas las condiciones de extracción, el perfil de compuestos volátiles del cacao se obtuvo empleando la técnica de micro extracción en fase sólida con el modo de espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

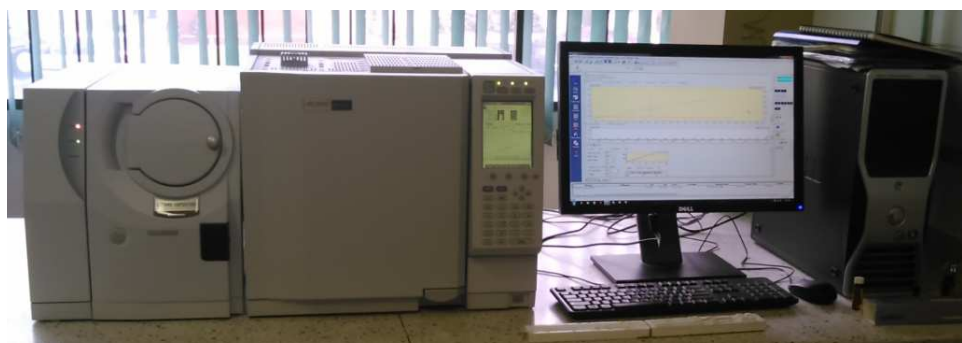
Los compuestos volátiles pre-concentrados por la fibra de SPME a partir de las muestras de cacao, se sometieron a un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para separarlos e identificarlos. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (GC-MS) Shimadzu QP2010S (Imagen 15). Se realizaron ensayos a las muestras de cacao regional y el clon CCN51 por triplicado.

85 MIRALLES-GARCIA J. Op Cit. p. 50.

Las condiciones de separación y el programa de temperatura fueron similares a las usadas para GC-FID en todos los casos. Los espectros de masas se obtuvieron en el modo full scan, la técnica de ionización empleada fue impacto electrónico (EI) a 70 eV con un barrido de 1.8 scans/s y con un rango de m/z 35-300.

Los criterios de identificación de los compuestos fueron dos: primero comparando los espectros de masa de cada compuesto observado en el cromatograma de las muestras, con los espectros de la librería Wiley 275L y NIST instaladas en el equipo como soporte de identificación y en segundo lugar se efectuó el cálculo de índices de retención Kovats (ecuación 1).

Imagen 15. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas



Fuente: Equipo de la Universidad de Nariño. Laboratorios Especializados. Laboratorio de Cromatografía

$$IK = 100C_n + \left(\frac{tr_x - tr_n}{tr_N - tr_n} \right) \times 100 (C_N - C_n)$$

Ecuación 1.

Donde:

Ik = índice de Kovat's

x = analito problema

n = número de átomos de carbono del alcano que eluye antes de x

N = número de átomos de carbono del alcano que eluye después de x

T_{Rx} = tiempo de retención ajustado del analito x

T_{Rn} = tiempo de retención ajustado del n-alcano que eluye antes de x

T_{RN} = tiempo de retención ajustado del n-alcano que eluye después de x ⁸⁶

86 ALVAREZ A. Aislamiento, purificación e identificación de los principios tóxicos alcaloidales en plantas del género crotalaria y alimento contaminado para aves. Universidad industrial de Santander. p. 135. 2004

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de las condiciones óptimas de extracción de compuestos volátiles mayoritarios con la muestra de cacao CCN 51.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) que se utilizó para optimizar el método, permitió el modelado y el análisis de los datos en los que la extracción de COVs se ven influenciados por factores experimentales como: Temperatura (25, 40 y 60°C), Tiempo (15, 30 y 60 min.) y fibra (DVB/CAR-PDMS = 1, CAR/PDMS = 0 y DVB/PDMS = -1);⁸⁷ ya que estos factores pueden incrementar o disminuir la cantidad y concentración de compuestos. El mayor contenido de COVs es una función de los niveles de cada uno de los factores experimentales.

Para determinar las condiciones óptimas de extracción, se tuvo en cuenta las siguientes variables de respuesta: a) número de COVs con un área ≥ 100 cuentas (COVs 100), b) número de COVs con un área ≥ 500 cuentas (COVs 500), c) número de COVs con un área ≥ 1000 cuentas (COVs 1000) y d) la mayor área total de cada extracción de COVs (COVs TOTAL).

Con estos factores se construyó un modelo de optimización para cada variable de respuesta anteriormente mencionadas. Se tomó como variable de respuesta el número de COVs extraídos con un área ≥ 100 cuentas, valor mínimo estimado, por presentar el mayor número de COVs, y que permitió notar el comportamiento de los efectos principales y sus interacciones.

Las estimaciones para cada uno de los efectos experimentales y sus interacciones permitieron establecer el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual determinó su error experimental.

87 BASTIDAS A. "Estudio Químico De Los Componentes Volátiles (HS-SPME) Y Análisis De La Composición De Taninos Y Cafeína En Un Tipo De Café Tostado Y Molido Tradicional Colombiano". Director: Nelson Hurtado. Tesis de pregrado. Universidad de Nariño, programa de Química. Pasto. 2010.

Tabla 2. Efectos estimados en la extracción 100 COVs.

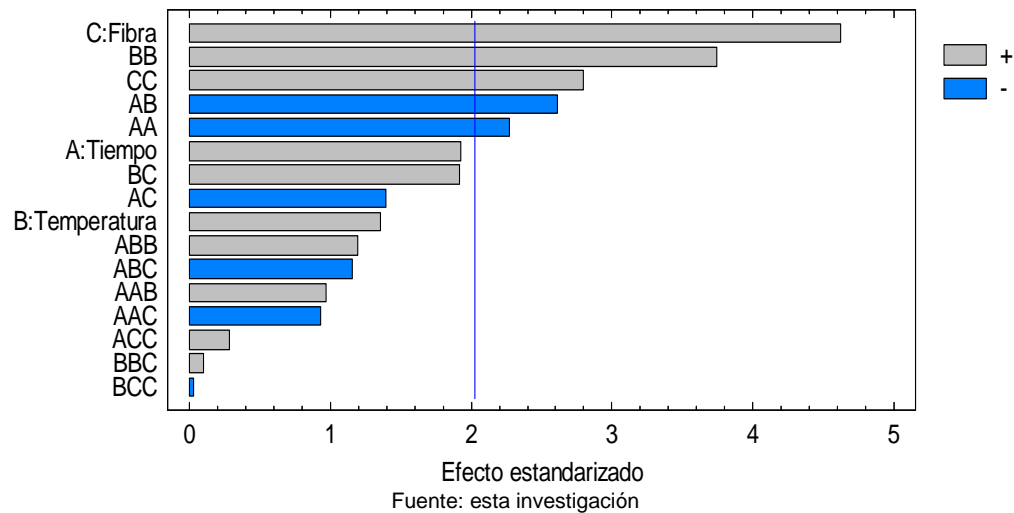
| Efectos experimentales y sus interacciones | Estimado del número de COVs | Error Estándar |
|---|------------------------------------|-----------------------|
| Promedio global del análisis cromatográfico | 60,0218 | 3,36103 |
| A: Tiempo | 12,3296 | 6,40378 |
| B: Temperatura | 9,53218 | 7,00614 |
| C: Fibra | 32,8979 | 7,11786 |
| AA | -12,9291 | 5,68645 |
| AB | -9,15975 | 3,50342 |
| AC | -4,89772 | 3,50954 |
| BB | 19,1875 | 5,1207 |
| BC | 6,7942 | 3,53477 |
| CC | 14,0148 | 5,00751 |
| AAB | 6,73986 | 6,92918 |
| AAC | -6,5 | 6,95271 |
| ABB | 7,3125 | 6,10428 |
| ABC | -4,8522 | 4,19972 |
| ACC | 1,71429 | 5,95947 |
| BBC | 0,631944 | 6,2163 |
| BCC | -0,189189 | 6,04829 |
| Bloque | -3,77778 | 2,33589 |

Fuente: esta investigación

En la tabla anterior (Tabla 2), se observa que el promedio global de los 54 análisis cromatográficos fue aproximadamente de 60 COVs extraídos, con un área ≥ 100 cuentas. Este valor estimado, permitió establecer el comportamiento de los factores principales y sus interacciones, mediante el cambio en el promedio global como variable de respuesta, al pasar el factor de un nivel bajo a un nivel alto.

El tipo de fibra empleada, fue determinante en la extracción de los COVs. Además, se observó que las interacciones (BB y CC) presentan un efecto de aumento (signo +) en la extracción de COVs expresados en unidades (número de COVs) por término medio. Es decir, la interacción BB indicó que el cambio en la temperatura es significativo, al realizar las extracciones con una temperatura de 25°C a una temperatura de 60°C, el aumento se da en 19,1875 COVs extraídos más que el promedio global. Los efectos estimados de los experimentos realizados se aprecian a continuación en el diagrama de Pareto (gráfica 1).

Gráfica 1. Diagrama de Pareto para la Extracción de COVs 100.



La significancia estadística de los efectos se realizó mediante una ANOVA. En la tabla 3 se observa que se particionó la variabilidad de COVs ≥ 100 , en bloques separados para cada uno de los efectos. Lo que permitió probar la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 1 factor principal y 4 interacciones (AA, AB, BB y CC), tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Estableciendo que el TIPO de FIBRA, tuvo un efecto significativo durante el proceso de extracción, esto se evidenció a partir del gráfico de efectos principales (Grafico 2).

Tabla 3. Análisis de varianza para la extracción de COVs 100.

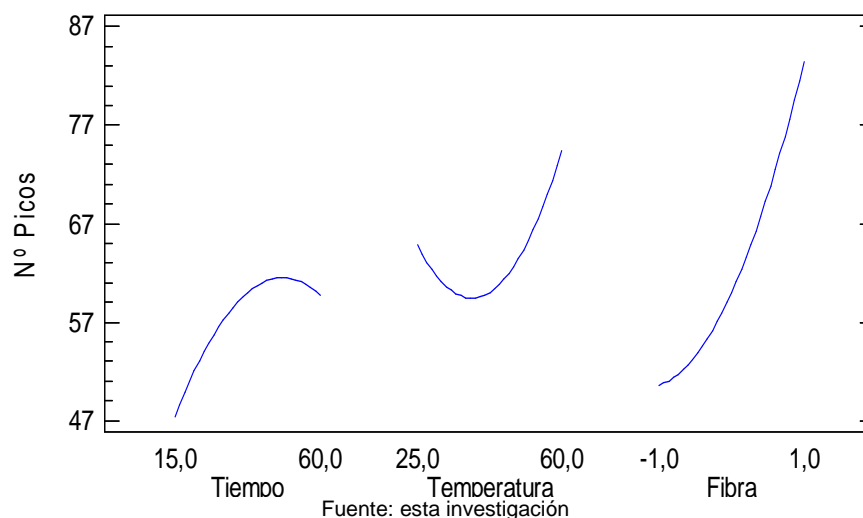
| Factores Experimentales | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A: Tiempo | 273,062 | 1 | 273,062 | 3,71 | 0,0621 |
| B: Temperatura | 136,353 | 1 | 136,353 | 1,85 | 0,1821 |
| C: Fibra | 1573,54 | 1 | 1573,54 | 21,36 | 0,0000 |
| AA | 380,795 | 1 | 380,795 | 5,17 | 0,0291 |
| AB | 503,528 | 1 | 503,528 | 6,84 | 0,0130 |
| AC | 143,459 | 1 | 143,459 | 1,95 | 0,1714 |
| BB | 1034,23 | 1 | 1034,23 | 14,04 | 0,0006 |
| BC | 272,14 | 1 | 272,14 | 3,69 | 0,0625 |
| CC | 576,991 | 1 | 576,991 | 7,83 | 0,0082 |
| AAB | 69,6911 | 1 | 69,6911 | 0,95 | 0,3372 |
| AAC | 64,381 | 1 | 64,381 | 0,87 | 0,3561 |
| ABB | 105,707 | 1 | 105,707 | 1,44 | 0,2388 |
| ABC | 98,3276 | 1 | 98,3276 | 1,33 | 0,2556 |

| | | | | | |
|---------------|-----------|----|-----------|------|--------|
| ACC | 6,09524 | 1 | 6,09524 | 0,08 | 0,7753 |
| BBC | 0,761261 | 1 | 0,761261 | 0,01 | 0,9196 |
| BCC | 0,0720721 | 1 | 0,0720721 | 0,00 | 0,9752 |
| Bloques | 192,667 | 1 | 192,667 | 2,62 | 0,1145 |
| Error total | 2651,81 | 36 | 73,6613 | | |
| Total (corr.) | 18797,3 | 53 | | | |

Fuente: esta investigación

Según el gráfico 2, a un nivel alto de temperatura (60°C), se favorece la extracción de COVs, y se puede apreciar que existe una diferencia bien definida en el tipo de fibra que se empleó, en este caso, la que genera los mejores resultados fue la fibra con tres revestimientos DVB/CAR-PDMS de carácter bipolar. En cuanto al tiempo, se observó que la extracción no se favorece al tiempo máximo (60min.), esto se debe a que la fibra alcanza estados de saturación, por lo que a tiempos superiores ocurre un proceso de desorción.

Gráfica 2. Factores principales de la extracción de COVs 100



Fuente: esta investigación

Lo anterior permitió establecer, cuales son los principales factores experimentales a tener en cuenta para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de COVs ≥ 100 . Estos factores presentaron un modelo ajustado de segundo orden, que permitió estimar el comportamiento a seguir para alcanzar la región de optimización. En la tabla 4 se puede observar estos detalles.

Tabla 4. Coeficientes de regresión para COVs 100.

| <i>Coeficiente</i> | <i>Estimado</i> |
|--------------------|-----------------|
| Constante | -0,41302 |
| A:Tiempo | 3,89691 |
| B:Temperatura | 0,272008 |
| C:Fibra | -4,7038 |
| AA | -0,0289356 |
| AB | -0,085262 |
| AC | 0,634508 |
| BB | 0,0114286 |
| BC | 0,337479 |
| CC | 5,80856 |
| AAB | 0,0 |
| AAC | 0,0 |
| ABB | 0,000530612 |
| ACC | 0,0380952 |
| BBC | 0,0 |
| BCC | -0,00540541 |
| ABC | -0,0111691 |

Fuente: esta investigación

Con los resultados anteriores se estimó la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\mathbf{N^{\circ} Picos = -0,41302 + 3,89691*Tiempo + 0,272008*Temperatura - 4,7038*Fibra}$$

Ecuación 2

La ecuación 2 expresa la relación que existe en la interacción de los tres factores experimentales principales.

A continuación, se procedió a determinar las condiciones óptimas de extracción de los COVs, a partir de las demás variables de respuesta, para lo cual se utilizó el proceso de optimización de análisis multivariable. La prioridad del análisis, es alcanzar la mayor deseabilidad (expresar un valor de respuesta igual a y sobre una escala de 0 a 1 en la ecuación de un polinomio de segundo grado), en la extracción del número de COVs, a partir de la evaluación de las cuatro variables de respuestas.

El proceso estadístico utilizado permitió determinar la combinación de los factores experimentales, que simultáneamente optimizan las cuatro variables de respuestas, maximizando la función de deseabilidad. En la tabla de datos experimentales de la metodología de superficie de respuesta (anexo A), muestra

la función de deseabilidad evaluada en cada punto del diseño experimental. Entre los puntos del diseño, la deseabilidad máxima experimental, se alcanzó en la corrida de análisis 9, con un valor de 0.707504; con niveles experimentales de 60°C, 60min y fibra DVB/CAR-PDMS, parámetros que se acercan a la región óptima del diseño experimental.

El proceso de determinación de la máxima deseabilidad, permitió establecer parámetros teóricos óptimos para el proceso de extracción de COVs, basados en la determinación de la deseabilidad global óptima. Se detallan las condiciones óptimas en la tabla 5.

Tabla 5. Deseabilidad global óptima para extracción de COVs para SPME

Valor óptimo = 0.700727

| Factores experimentales | Niveles | | Óptimo | Variables de respuesta | Valores óptimos |
|-------------------------|---------|------|---------|------------------------|-----------------|
| | Bajo | Alto | | COVs 100 | 100.213 |
| Temperatura (°C) | 25 | 60 | 60 | COVs 500 | 67.0632 |
| Tiempo (min.) | 15 | 60 | 49.8622 | COVs 1000 | 46.004 |
| Fibra | -1 | 1 | 1 | Área Total | 453445 |

Fuente: esta investigación

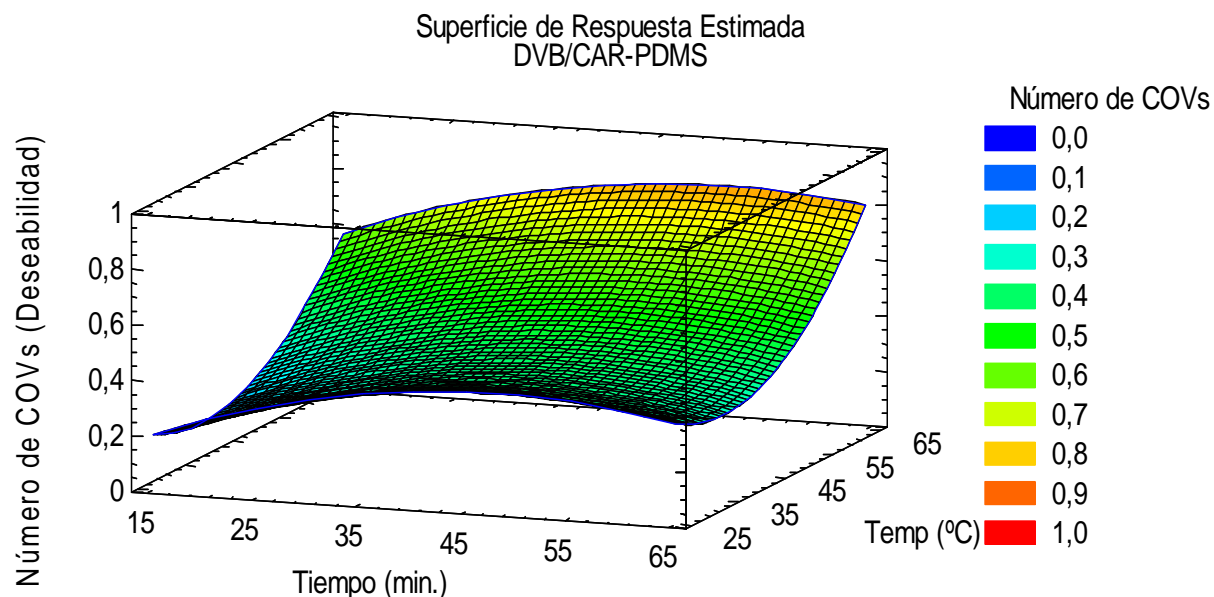
Las cuatro variables experimentales presentan su mayor significancia en los niveles de diseño experimental de 60°C, 50min. y la fibra 1 (DVB/CAR-PDMS), donde los valores teóricos de extracción de numero de COVs es de 100,213; 67,0632; 46,004 y para las variables de respuesta de COVs 100, 500 y 1000 respectivamente, y de una AREA TOTAL de 453445 cuentas para el total de COVs

Los estudios que se han llevado a cabo indican que un aumento de temperatura favorece el alcance de equilibrio entre las tres fases presentes en la extracción de COVs por la técnica de HS-SPME⁸⁸, lo cual coincide con los resultados encontrados.

En la gráfica 3 se puede apreciar el comportamiento estimado en la combinación de dos factores (Tiempo y Temperatura), manteniendo constante el tipo de fibra DVB/CAR-PDMS, lo que permitió establecer niveles óptimos de extracción de COVs, mediante la interacción de los tres factores experimentales principales. Los valores se detallan en la tabla 5.

88 ROJAS-MONROY G. Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Tesis de Maestría, Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico, 2005.

Gráfica 3. Superficie de respuesta estimada para la extracción de COVs



Al final del estudio de los factores y las variables, se logró identificar cuáles son las condiciones óptimas para el análisis del aroma mediante la técnica de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME). Los parámetros encontrados se aprecian en la tabla 6.

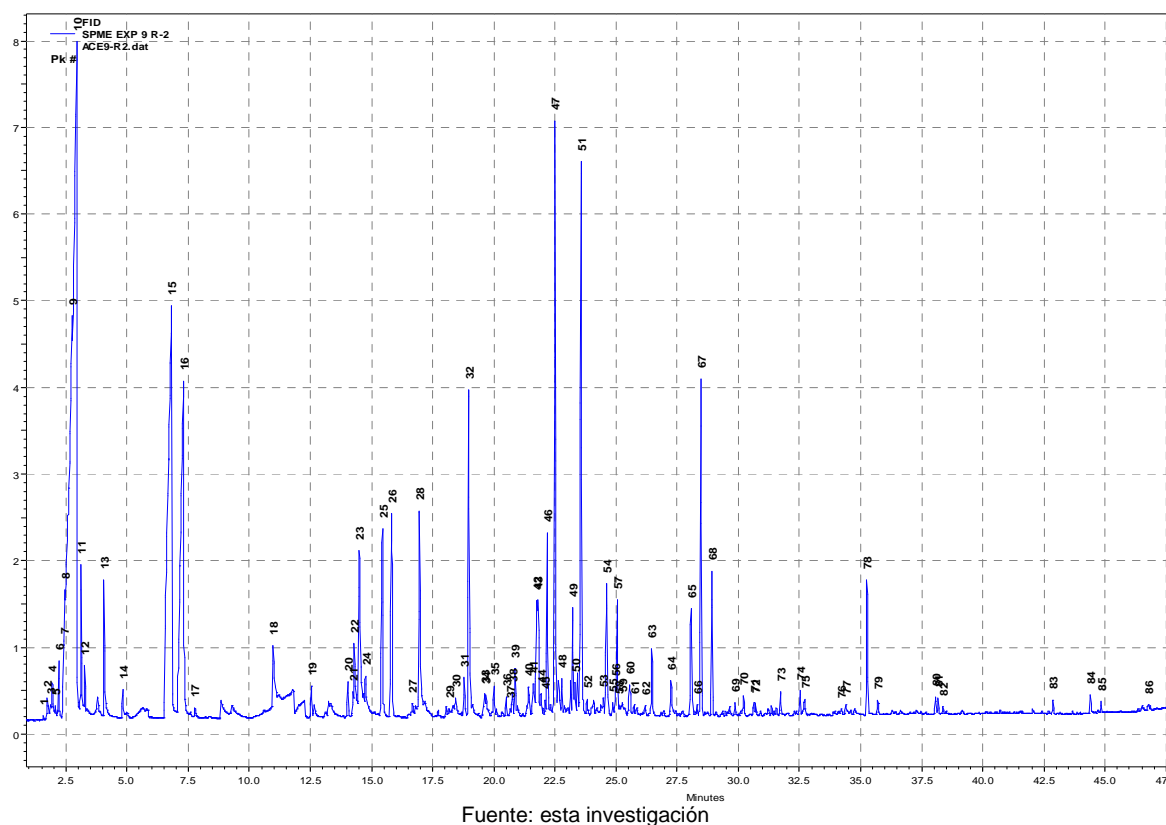
Tabla 6. Condiciones óptimas de extracción de COVs por la técnica HS-SPME.

| Factores experimentales principales | Niveles |
|-------------------------------------|--------------|
| Temperatura (°C) | 60 |
| Tiempo (min.) | 50 |
| Fibra | DVB/CAR-PDMS |

Fuente: esta investigación

En la imagen 16 se observa el cromatograma obtenido en las condiciones óptimas del cacao CCN51 por GC-FID. Los tiempos de retención áreas y porcentajes relativos del Cromatograma se presentan en el anexo B. En el cromatograma se observa un total de 86 picos.

Imagen 16. Cromatograma del cacao CCN51 en las condiciones óptimas de extracción



4.2 Identificación de los COVs mayoritarios en el cacao tostado y molido (Licor) por GC-MS.

En la segunda etapa del estudio se utilizaron las condiciones de análisis encontradas mediante el diseño experimental para la identificación de los compuestos volátiles mayoritarios de dos variedades de cacao (CCN51 y cacao regional) por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), también se desarrolló un análisis de los COVs entre dos muestras de cacao regional (Tabla 7), teniendo en cuenta que cada muestra presento días de fermentación diferentes.

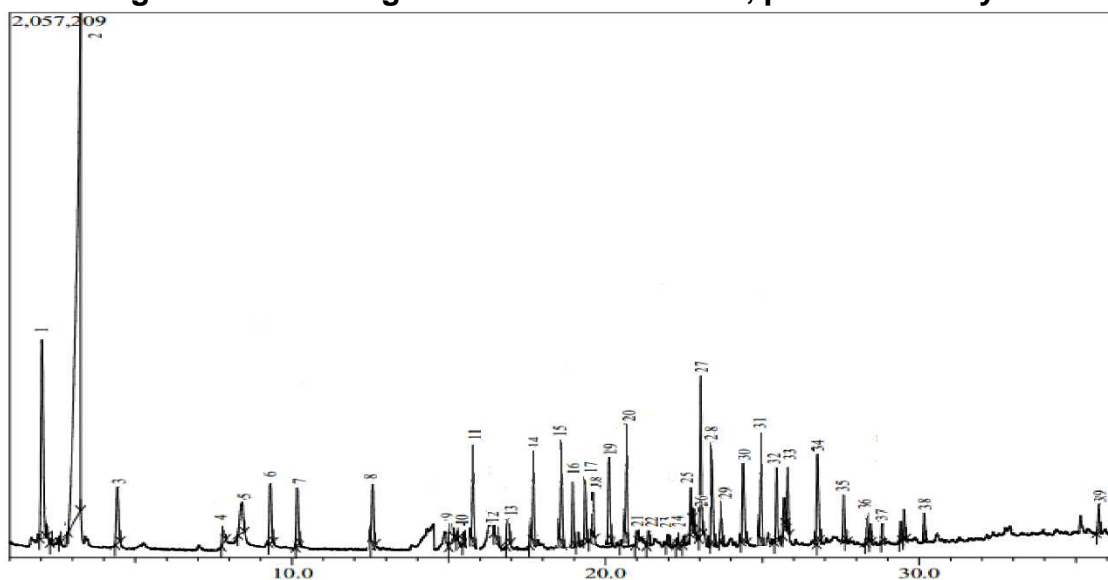
Tabla 7. Clases de cacao estudiadas.

| Código | Variedad | Días de fermentación | Origen |
|--------|----------------|----------------------|---------------------|
| CCN51 | Clon | 9 | Asociación CORTEPAZ |
| R-5 | Cacao regional | 5 | Asociación CORTEPAZ |
| R-6 | Cacao regional | 6 | Asociación CORTEPAZ |

4.2.1 Identificación de COVs del cacao CCN51.

El cromatograma que se presenta en la imagen 17 fue el obtenido para la muestra de cacao CCN51 por GC-MS, en las condiciones óptimas determinadas experimentalmente. El cromatograma que se encuentra en el anexo C se pueden apreciar 43 compuestos de una de las replicas, de los cuales se seleccionaron 39 COVs siendo los comunes entre las tres replicas realizadas, éstos se pueden observar en la imagen 17. Por otra parte, en la tabla 8 se presentan los compuestos identificados para el cacao CCN51. Esta identificación se llevó a cabo empleando el cálculo de los índices de retención de Kovats (ecuación 1) comparando los resultados con la base de datos ADAMS⁸⁹, y se identificó los compuestos mediante la comparacion de sus espectros de masas con los teoricos publicados en las bases de datos NIST⁹⁰ y Wiley⁹¹. Además de esta información también se presentan las características organolépticas de cada uno de los compuestos identificados.

Imagen 17. Cromatograma del cacao CCN51, por HS-SPME y GC-MS



Fuente: esta investigación

89 ADAMS R. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Baylor university. 2004.

90 NIST. Índice de retención de Kovats teórico. [Citado octubre 2016]. Base de datos en línea. Disponible en: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>

91 WILEY. Espectros de masas. Base de datos equipo (cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas SHIMATZU CUPER-2010s

Tabla 8. COVs identificados del cacao CCN51 y las notas odoríficas producidas.

| Grupo | N° Pico | TR ^a | Área | Compuesto | Nota producida ⁹² | Ik E ^b | Ik T ^c |
|-------------------|---------|-----------------|---------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------------|
| Aldehídos-Cetonas | 3 | 4.433 | 481238 | 3- metil butanal | caramelo-chocolate | ----- ^d | 655 |
| | 4 | 7.823 | 64410 | 2-metil butanal | rancio-chocolate-malta fermentada | ----- ^d | 641 |
| | 5 | 8.410 | 564419 | 3-hidroxi-2-butanona | dulce-mantequilla-crema | 719 | 721 |
| | 16 | 19.356 | 366276 | Benzaldehído | dulce-cereza-almendra amarga | 976 | 960 |
| | 17 | 19.490 | 338851 | 5-metil-furfural | picante- caramelo- arce | 981 | 964 |
| | 22 | 21.994 | 128713 | Bencen acetaldehído | dulce-floral-clavo-miel-cacao-jacinto | 1064 | 1042 |
| | 25 | 23.694 | 674374 | Acetofenona | dulce- acre-almendra - acacia | 1087 | 1065 |
| | 29 | 23.385 | 294540 | 2-nonanona | coco-herbal-dulce-frutal-queso | 1116 | 1096 |
| | 30 | 24.393 | 600442 | 2-isopropil-5-metil-2-hexenal | Uva | 1125 | 1097 |
| | 32 | 25.696 | 572948 | Trans-ISOMENTONA | menta fresca-menta dulce | 1176 | 1124 |
| | 34 | 26.786 | 662013 | Cis-ISOMENTONA | menta fresca-menta dulce | 1187 | 1132 |
| | 37 | 28.448 | 157475 | 2-fenil-2-butenal | chocolate tostado | 1302 | 1279 |
| | 39 | 35.730 | 274835 | 5-metil-2-fenil-2-hexenal | chocolate-amargo-almendra | 1528 | 1482 |
| Alcoholes | 1 | 2.026 | 2661704 | 2-propanol | alcohol-leñoso-almizcle | ----- ^d | 515 |
| | 5 | 9.289 | 709482 | 2,3-butanediol | frutal-cebolla | 809 | 789 |
| | 6 | 10.166 | 514198 | 1,3-butanediol | inodoro | 818 | NR |
| | 9 | 15.037 | 150143 | 2-furanmetanol | alcohol-rancio-dulce-caramelo | 882 | 865 |
| | 10 | 15.261 | 138762 | 2-heptanol | Fresco-herbal-dulce-floral | 921 | 906 |
| | 31 | 25.451 | 667710 | Bencen etanol | floral-rosas-seco-agua de rosas | 1144 | 1113 |
| Pirazinas | 7 | 12.574 | 616900 | 2-metil-pirazina | nuez-chocolate tostado | 832 | 826 |
| | 11 | 15.476 | 813341 | 2,5-dimetil-pirazina | Café | 925 | 912 |
| | 13 | 16.889 | 98232 | 2,3-dimetil-pirazina | caramelo-chocolate | 933 | 920 |
| | 18 | 19.579 | 261458 | 2-etil-6-metil-pirazina | patata asada | 1013 | 991 |
| | 19 | 20.515 | 546055 | 2-etil-5-metil-pirazina | tostado | 1016 | 994 |
| | 20 | 21.001 | 880051 | Trimetil pirazina | nuez-cacahuete | 1018 | 1000 |
| | 27 | 23.038 | 1377789 | 3-etil-2,5-dimetil-pirazina | patata-cacao-nuez tostada | 1097 | 1063 |
| | 28 | 23.369 | 757005 | Tetrametil pirazina | chocolate | 1105 | 1086 |
| | 33 | 25.812 | 409863 | 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina | caramelo | 1182 | 1163 |
| | 38 | 29.522 | 215555 | 3-isopentil-2,5-dimetil-pirazina | alcanfor-tomillo-herbal-pino-agrio | 1342 | 1308 |
| | | | | | | | |
| Esteres | 14 | 17.624 | 766774 | Butanoato de etilo | frutal-piña-coñac | 954 | 804 |
| | 15 | 19.116 | 788831 | Acetato de etilo | etereo- dulce-frutas-maleza verde | 961 | 806 |
| | 21 | 21.384 | 88082 | Acetato de sec- butilo | solvente-banana | 1059 | NR |
| | 24 | 22.494 | 335573 | Meso-diacetato de 2,3-butandiol | ----- | 1079 | 1054 |
| | 26 | 22.815 | 116178 | D,l-diacetato de 2,3-butandiol | ----- | 1091 | 1064 |

| | | | | | | | |
|-----------------|----|--------|----------|------------------------|-----------------------------------|------------|------|
| | 35 | 27.665 | 295984 | Caprilato de etilo | Piña | 1217 | 1197 |
| | 36 | 28.327 | 516806 | Fenil acetato de etilo | floral- miel-Rosa-balsámico-cacao | 1270 | 1243 |
| Terpeno | 23 | 22.301 | 75137 | Beta-Ocimeno (E) | cítrico-tropical-terpénico-leñoso | 1068 | 1050 |
| Ácidos | 2 | 3.258 | 13705248 | Ácido acético | vinagre | ----- d | 625 |
| Lactonas | 12 | 16.515 | 79817 | Gamma butirrolactona | crema-aceite-caramelo-pan-café | 930 | 908 |

^aTiempo de retención, ⁱndice de Kovats experimental, ^tndice de Kovats teórico, ⁿndice de Kovats no calculado, NR: no reportado. Fuente: esta investigación

Como se aprecia en la tabla 8 se identificaron siete clases de familias orgánicas, siendo más numeroso el grupo de aldehídos-cetonas con un total de 13 compuestos, seguido por las pirazinas con 10 y los ésteres con 7; de los cuales la acetofenona es la de mayor área de los aldehídos-cetonas, este es producido durante la fermentación, PORTILLO reporta que este compuesto es generado al cuarto día de fermentación⁹³ y genera notas florales. La 3-etil-2,5-dimetil-pirazina, como la mayoría de compuestos de esta familia se origina por medio de la reacción de Maillard (diagramas 2 y 3) y son los principales COVs responsables del aroma característico de las semillas de cacao, este compuesto fue el que presento la mayor área en esta familia. Por su parte, el acetato de etilo fue el mayoritario de la familia de esterres, este se origina durante las últimas etapas de fermentación y produce notas frutales. Por otra parte, el ácido acético fue el compuesto más abundante (o de mayor área) en el cacao, generando aroma a vinagre este se produce en el proceso de fermentación.⁹⁴

4.2.2 Identificación de COVs del cacao regional fermentado 5 días (R-5)

El cromatograma que se presenta en el anexo E fue el obtenido por GC-MS en las condiciones óptimas desarrolladas en este trabajo, para la muestra de cacao regional (R-5) fermentado por 5 días donde se encontraron 39 señales. En la imagen 18 se pueden observar los 33 COVs mayoritarios para su identificación.

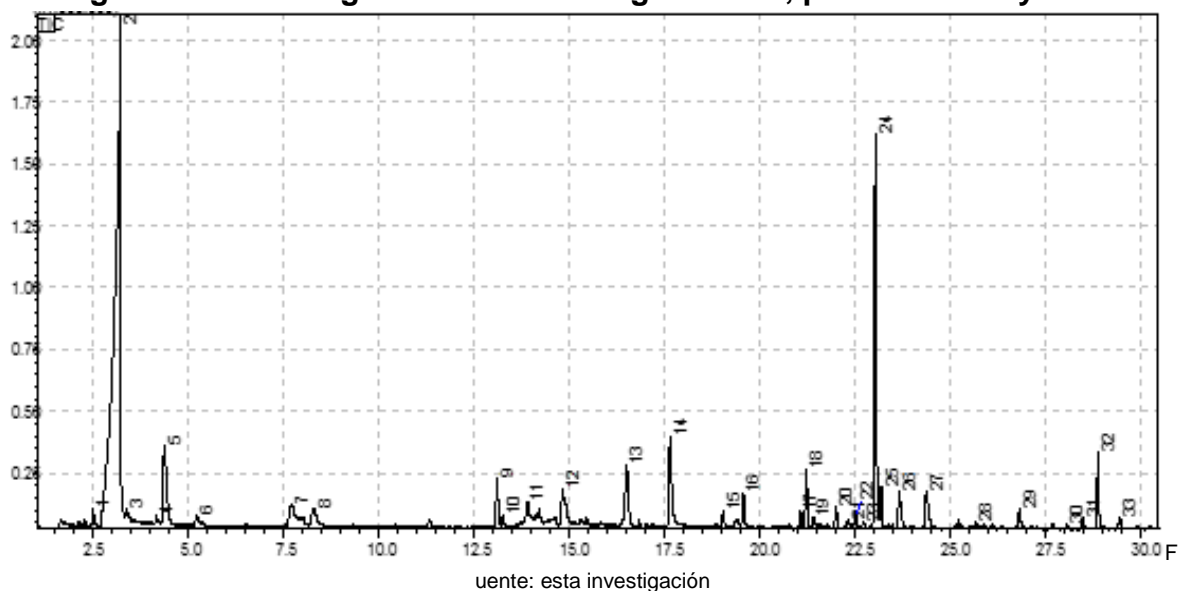
92 Características organolépticas. Base de datos en línea. [Citado agosto 2016]. Disponible en: <http://www.thegoodscentscompany.com/search3.php?qName=Phenylacetate&submit.x=0&submit.y=0>

93 PORTILLO, Op. Cit. p.9

94 FRAUENDORFER F. SCHIEBERLE P. "Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans durin groastin". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, p.10244-10251.2008

En la tabla 9 se puede apreciar los resultados de identificación para el cacao R-5, la identificación se llevó a cabo empleando el cálculo de índice de retención de Kovats (ecuación 1), los resultados fueron comparados con literatura científica, y corroborados con los espectros de masas publicados en las bases de datos ADAMS NIST y WILEY^{95, 96,97}.

Imagen 18. Cromatograma del cacao regional R-5, por HS-SPME y GC-MS



En la tabla 9 también se observa la clasificación de los 33 COVs mayoritarios, clasificados en diferentes grupos de familias orgánicas, donde se puede apreciar que la mayor cantidad de compuestos se presentaron para las familias de aldehídos-cetonas y ésteres con un total de 9 compuestos cada uno; el benzaldehído y acetato de isoamil figuraron con la mayor concentración (área), los cuales le generan al cacao notas frutales y a almendras. Al igual que en el cacao CCN51, el ácido acético fue el compuesto que presentó una mayor concentración, seguido por la tetrametil pirazina, siendo éste último compuesto muy importante en la calidad organoléptica, puesto que genera notas aromáticas propias del cacao.⁹⁸

95 ADAMS, Op. Cit.

96 NIST, Op. Cit

97 WILEY, Op. Cit

98 FRAUENDORFER F. SCHIEBERLE P. 2008. Op. Cit.

Tabla 9. COVs identificados en cacao regional fermentado 5 días (R-5) y notas odoríficas producidas.

| Grupo | N° Pico | TR ^a | Área | Compuesto | Nota producida ⁹⁹ | Ik E ^b | Ik T ^c |
|-------------------|---------|-----------------|----------|-----------------------------------|--|-------------------|-------------------|
| Aldehídos-Cetonas | 1 | 2.526 | 224908 | 2,3-butanodiona | mantequilla-dulce-caramelo-crema | ---- ^d | 600 |
| | 3 | 3.417 | 102870 | 2-metil butanal | rancio-chocolate-nuez-malta | ---- ^d | 641 |
| | 5 | 4.391 | 1636472 | 3-hidroxi-2-butanona | dulce-mantequilla-crema | 717 | 721 |
| | 11 | 13.902 | 317843 | 2-heptanona | frutal-picante-dulce-herbal-coco | 903 | 892 |
| | 14 | 17.646 | 1799788 | Benzaldehído | dulce-cereza-almendra amarga | 977 | 960 |
| | 19 | 21.400 | 153217 | Bencen acetaldehído | dulce-floral-clavo-miel-cacao-jacinto | 1064 | 1042 |
| | 21 | 22.311 | 117992 | Acetofenona | dulce- mimosa -almendra - acacia | 1087 | 1065 |
| | 25 | 23.188 | 541843 | 2-nonanona | coco-herbal-dulce-frutal-queso | 1110 | 1096 |
| | 33 | 29.426 | 137174 | 2-fenil-2-butenal | chocolate tostado | 1302 | 1279 |
| Alcoholes | 4 | 4.195 | 46541 | 2-pentanol | dulce-rancio-vino-banana-alcohol | 712 | NR |
| | 6 | 5.236 | 91856 | 3-metil-1-butanol | alcohólico-Whisky- frutal-banana | 742 | 741 |
| | 7 | 7.723 | 397413 | 2,3-butanediol | frutal-cebolla | 808 | 789 |
| | 8 | 8.314 | 350342 | 1,3-butanediol | Inodoro | 817 | NR |
| | 12 | 14.843 | 710878 | 2-heptanol | herbal-dulce-floral-frutas verdes | 922 | 906 |
| | 27 | 24.368 | 816167 | Bencen etanol | floral-rosas-seco-agua de rosas | 1144 | 1113 |
| Pirazinas | 13 | 16.515 | 973863 | 2,3-dimetil-pirazina | caramelo-chocolate | 934 | 920 |
| | 16 | 19.565 | 467582 | Trimetil pirazina | nuez-cacahuete | 1018 | 1000 |
| | 24 | 23.026 | 6222763 | Tetrametil pirazina | Chocolate | 1105 | 1086 |
| | 28 | 25.673 | 59717 | 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina | Caramelo | 1182 | 1163 |
| Ésteres | 9 | 13.110 | 885002 | Acetato de isoamil | dulce-afrutado-banana-solvente | 890 | 874 |
| | 10 | 13.264 | 150263 | Acetato de 2-metil-butilo | fruta-dulce-banana | 891 | 877 |
| | 18 | 21.220 | 873046 | Acetato de sec- butilo | solvente-banana | 1059 | NR |
| | 20 | 22.000 | 328680 | Di-diacetato de 2,3-butanediol | ----- | 1079 | 1054 |
| | 22 | 22.516 | 165835 | Meso-diacetato de 2,3-butaneodiol | ----- | 1092 | 1064 |
| | 29 | 26.803 | 203184 | Caprilato de etilo | Piña | 1217 | 1197 |
| | 30 | 28.041 | 108645 | Acetato de 2-octilo | terroso-herbal-humus | 1257 | 1196 |
| | 31 | 28.456 | 666653 | Fenil acetato de etilo | dulce-floral- miel-Rosa-balsámico-cacao | 1270 | 1243 |
| | 32 | 28.857 | 883738 | Acetato de 2-fenil etilo | floral -rosa-dulce-miel- fruta- tropical | 1283 | 1255 |
| Terpenos | 15 | 19.035 | 237412 | Beta-Mirceno | terpénicos- picante- balsámico | 1005 | 991 |
| | 17 | 21.062 | 213815 | Beta-Ocimeno (Z) | cítrico-tropical-terpénico-leñoso | 1056 | 1037 |
| | 26 | 23.650 | 844683 | Alfa-Terpinoleno | leñoso-terpénico-limón-herbal-cítrico | 1123 | 1089 |
| Ácidos | 2 | 3.258 | 20039362 | Ácido acético | Vinagre | ---- ^d | 625 |
| Pirrol | 23 | 22.721 | 134440 | 2-acetil-pirrol | rancio-nuez-cumarínico-regaliz-nuez | 1097 | 1059 |

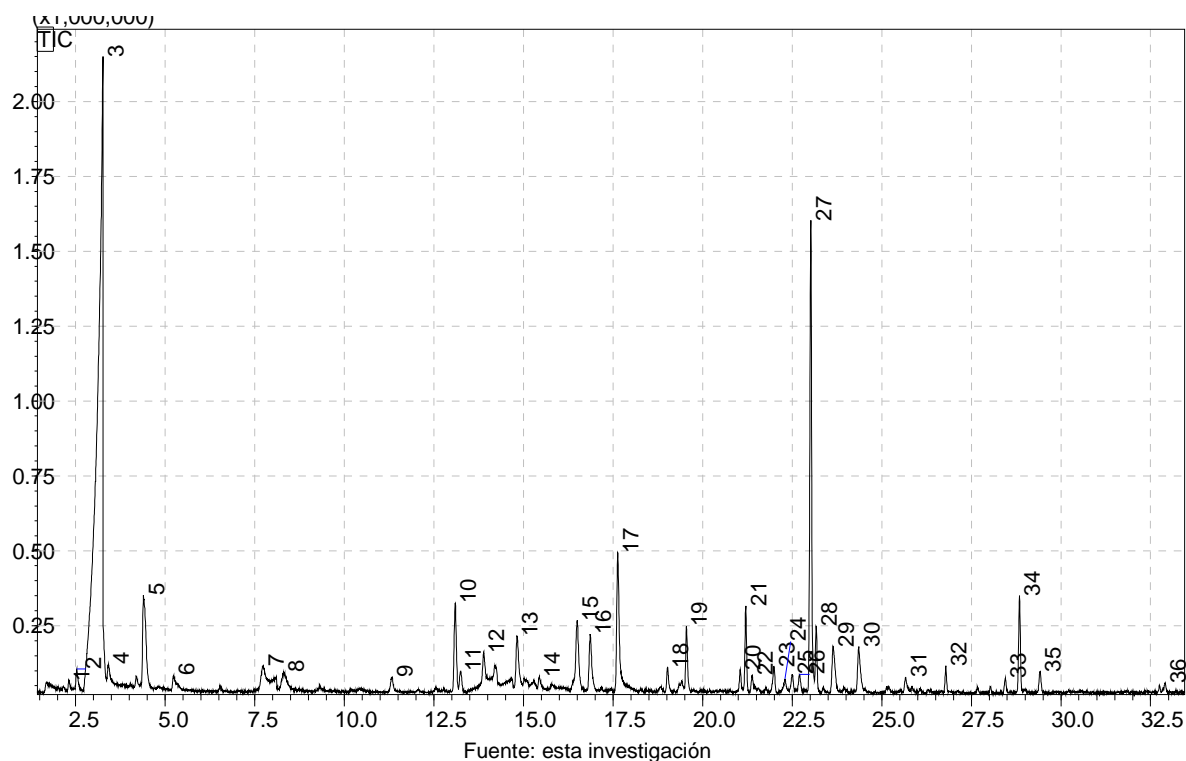
^a Tiempo de retención, ^b Índice de Kovats experimental, ^c Índice de Kovats teórico, ^d Índice de Kovats no calculado, NR: no reportado. Fuente: esta investigación

99 Características organolépticas. Op. Cit.

4.2.3 Identificación de COVs del cacao regional fermentado 6 días (R-6) y las notas odoríficas producidas.

En la imagen 19 se observa el cromatograma por GC-MS del cacao regional fermentado por 6 días, donde se lograron identificar un total de 36 compuestos, en el que se aprecian dos señales importantes correspondientes al ácido acético y la tetrametil pirazina. En el anexo F se presenta el cromatograma obtenido experimentalmente. En la tabla 10 se presenta la identificación de los 36 COVs agrupados en 7 familias de compuestos orgánicos diferentes; en la tabla también se presenta la descripción organoléptica de cada uno de los COVs. La identificación se realizó de forma similar que en el cacao CCN51 y el R-5, comparando los índices de retención y los espectros de masas con los datos reportados en las bases de datos ADAMS,¹⁰⁰ NIST¹⁰¹ y WILEY.¹⁰²

Imagen 19. Cromatograma del cacao regional R-6, por HS-SPME y GC-MS



100 ADAMS, Op. Cit.

101 NIST, Op. Cit

102 WILEY, Op. Cit

Tabla 10. COVs identificados del cacao regional fermentado 6 días (R-6) y las notas odoríficas producidas.

| Grupo | N° Pico | TR ^a | Área | Compuesto | Nota producida ¹⁰³ | Ik E ^b | Ik T ^c |
|---------------------|---------|-----------------|---------|-----------------------------------|--|-------------------|-------------------|
| Aldehídos y Cetonas | 1 | 2.316 | 87126 | Butanal | acre-cacao-rancio-malta- pan | ---- ^d | 596 |
| | 2 | 2.536 | 203262 | 2,3-butanediona | mantequilla- dulce- caramelo- picante- crema | ---- ^d | 600 |
| | 4 | 3.422 | 137396 | 2-metil butanal | rancio-chocolate-nuez-malta fermentada | ---- ^d | 641 |
| | 5 | 4.400 | 1717735 | 3-hidroxi-2-butanona | dulce-mantequilla-crema | 718 | 721 |
| | 12 | 13.896 | 412155 | 2-heptanona | frutal-picante-dulce-herbal-coco-leñoso | 903 | 892 |
| | 17 | 17.632 | 1853375 | Benzaldehído | dulce-cereza-almendra amarga | 976 | 960 |
| | 23 | 21.383 | 119811 | Bencen acetaldehído | verde-dulce-floral-clavo-miel-cacao-Jacinto | 1064 | 1042 |
| | 24 | 22.299 | 115335 | Acetofenona | dulce- acre - mimosa -almendra - acacia | 1086 | 1065 |
| | 28 | 23.167 | 519370 | 2-nonanona | coco-herbal-dulce-frutal-queso | 1109 | 1096 |
| | 35 | 29.412 | 255187 | 2-fenil-2-butenal | chocolate tostado | 1301 | 1279 |
| Alcoholes | 6 | 5.239 | 160023 | 3-metil-1-butanol | alcohólico-Whisky- frutal-banana | 743 | 741 |
| | 7 | 7.738 | 397549 | 2,3-butanediol | frutal-cebolla | 809 | 789 |
| | 8 | 8.305 | 394826 | 1,3-butanediol | Inodoro | 817 | NR |
| | 13 | 14.822 | 777990 | 2-heptanol | Fresco-herbal-dulce-floral-frutas verdes | 921 | 906 |
| | 30 | 24.355 | 711420 | Bencen etanol | floral-rosas-seco-agua de rosas | 1144 | 1113 |
| Pirazinas | 15 | 16.500 | 942924 | 2,3-dimetil-pirazina | caramelo-chocolate | 954 | 920 |
| | 19 | 19.546 | 655999 | Trimetil pirazina | nuez-cacahuete | 1018 | 1000 |
| | 27 | 23.019 | 5138116 | Tetrametil pirazina | Chocolate | 1105 | 1086 |
| | 31 | 25.664 | 143501 | 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina | Caramelo | 1182 | 1163 |
| Ésteres | 9 | 11.327 | 248209 | Acetato de 2-pentanol | jugo de naranja-frutos verdes-banana-nuez | 863 | NR |
| | 10 | 13.098 | 1239813 | Acetato de isoamil | dulce-afrutado-banana-solvente | 890 | 874 |
| | 11 | 13.242 | 203325 | Acetato de 2-metil-butanol | fruta-dulce-banana | 892 | 877 |
| | 14 | 15.444 | 125584 | Isovalerato de alilo | Fruta dulce- piña-banana-manzana-cereza | 933 | NR |
| | 16 | 16.862 | 763259 | Acetato de etilo | etéreo- dulce-frutas-maleza verde | 961 | 806 |
| | 22 | 21.204 | 784872 | Acetato de sec-butilo | solvente-banana | 1059 | NR |
| | 23 | 21.989 | 308211 | DI-diacetato de 2,3-butanediol | ----- | 1079 | 1054 |
| | 25 | 22.504 | 188655 | Meso-diacetato de 2,3-butaneodiol | ----- | 1092 | 1064 |
| | 32 | 26.785 | 236134 | Caprilato de etilo | Frutal- vino-dulce-albaricoque-brandy-pera | 1216 | 1197 |
| | 33 | 28.447 | 150943 | Fenil acetato de etilo | floral- miel-rosa-balsámico-cacao | 1270 | 1243 |
| | 34 | 28.841 | 1075218 | Acetato de 2-fenil etilo | floral-Rosa-dulce- miel- fruta tropical | 1283 | 1255 |
| | 36 | 32.909 | 79159 | Benzoato de isoamil | floral - verde- rancio-ámbar- balsámico | 1425 | 1441 |
| Terpenos | 18 | 19.022 | 258167 | Beta-Mirceno | terpénicos- picante- balsámico- plástico | 1005 | 991 |
| | 20 | 21.046 | 177015 | Beta-Ocimeno (Z) | cítrico-tropical-terpénico-leñoso | 1055 | 1037 |

| | | | | | | | |
|-----------------|----|--------|----------|------------------|---|-------------------|------|
| | 29 | 23.642 | 803437 | Alfa.Terpinoleno | leñoso-terpénico-limón-herbal-cítrico | 1123 | 1089 |
| Ácidos | 3 | 3.263 | 20204038 | Ácido acético | Vinagre | ---- ^d | 625 |
| Pirroles | 26 | 22,703 | 181995 | 2-acetil-pirrol | rancio-nuez-cumarínico-regaliz-nuez-pan | 1096 | 1059 |

^a Tiempo de retención, ^b Índice de Kovats experimental, ^c Índice de Kovats teórico, ^d Índice de Kovats no calculado, NR: no reportado

Fuente: esta investigación

Los resultados expuestos en la tabla 10 demuestran que el ácido acético y la tetrametil pirazina son los compuestos con mayor área, lo cual concuerda con lo reportado por AFOAKWA, como se había dicho anteriormente la tetrametil pirazina es compuesto muy importante en la calidad organoléptica del cacao; por otra parte, la familia de los esteres fueron los que se encontraron en mayor cantidad con un total de 13 compuesto diferentes, siendo el acetato de isoamil el de mayor área, y el que aporta notas frutales agradables al cacao.¹⁰⁴

4.3 Precisión del método de extracción

Se realizó como figura de mérito la precisión del método de extracción, determinando la repetibilidad del método analítico en las condiciones óptimas de análisis. Para este fin se analizó una muestra de cacao CCN51 por triplicado, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 11. En el anexo C se presenta un cromatogramas de las tres replicas y las tablas con los datos de cada replica

Los parámetros estadísticos de desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV %), permitieron verificar el grado de precisión en términos de repetibilidad de la extracción SPME, con valores de 1298-1196177 y 0,59-11,39; para s y CV %, respectivamente. El coeficiente de variación en porcentaje, para la micro extracción en fase solida (SPME) permite hasta del 12%¹⁰⁵

Por otra parte, se calculó la reproducibilidad del método, para esto, se tomaron los resultados cromatográficos de una muestra de cacao CCN51 analizados tres días diferentes, los resultados se consigan en la tabla 12 y se puede observar que el rango del coeficiente de variación esta entre 4,29 y 12,93. En el anexo D se encuentra la información relacionada de cada uno de los ensayos.

103 Características organolépticas. Op. Cit.

104 AFOAKWA EO, PATERSON A, FOWLER M, Ryan A. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. Food Chemistry 113: 208,215. 2009

105 GRANDA F. et al. Optimización del método de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía gaseosa para análisis de metanol en agua. Revista colombiana de Química. Grupo Procesos Físico-Químicos Aplicados, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2011.

Tabla 11: Resultados de la repetibilidad del método

| COMPUESTO | Pico | AREA R1 | AREA R2 | AREA R3 | PROMEDIO | s | CV% |
|-----------------------------------|------|----------|----------|----------|----------|---------|-------|
| 2-propanol | 1 | 2895213 | 2598714 | 2491185 | 2661704 | 209656 | 7,88 |
| Ácido acético | 2 | 12861048 | 14552698 | 13701998 | 13705248 | 1196177 | 8,73 |
| 3- metil butanal | 3 | 522404 | 470998 | 450312 | 481238 | 36350 | 7,55 |
| 2-metil butanal | 4 | 66522 | 63995 | 62713 | 64410 | 1787 | 2,77 |
| 3-hidroxi-2-butanona | 5 | 542650 | 590712 | 559895 | 564419 | 33985 | 6,02 |
| 2,3-butanediol | 6 | 714211 | 695123 | 719112 | 709482 | 13497 | 1,90 |
| 1,3-butanediol | 7 | 518382 | 514058 | 510154 | 514198 | 3058 | 0,59 |
| 2-metil-pirazna | 8 | 589656 | 610149 | 650895 | 616900 | 14491 | 2,35 |
| 2-furanmetanol | 9 | 151452 | 153288 | 145689 | 150143 | 1298 | 0,86 |
| 2-heptanol | 10 | 133903 | 142846 | 139537 | 138762 | 6324 | 4,56 |
| 2,5-dimetil-pirazina | 11 | 802743 | 820568 | 816712 | 813341 | 12604 | 1,55 |
| gamma butirrolactona | 12 | 75642 | 81554 | 82255 | 79817 | 4180 | 5,24 |
| 2,3-dimetil-pirazina | 13 | 99021 | 95462 | 100213 | 98232 | 2517 | 2,56 |
| Butanoato de etilo | 14 | 739479 | 818444 | 742399 | 766774 | 55837 | 7,28 |
| Acetato de etilo | 15 | 796559 | 715312 | 854622 | 788831 | 57450 | 7,28 |
| Benzaldehído | 16 | 355156 | 348251 | 395421 | 366276 | 4883 | 1,33 |
| 5-metil-furfural | 17 | 375609 | 341372 | 299572 | 338851 | 24209 | 7,14 |
| 2-etil-6-metil-pirazina | 18 | 274085 | 278952 | 231337 | 261458 | 3441 | 1,32 |
| 2-etil-5-metil-pirazina | 19 | 533570 | 515879 | 588716 | 546055 | 12509 | 2,29 |
| trimetil-pirazina | 20 | 875252 | 813655 | 951246 | 880051 | 43556 | 4,95 |
| acetato de sec butilo | 21 | 95166 | 82972 | 86118 | 88085 | 8622 | 9,79 |
| Bencen acetaldehído | 22 | 121357 | 116231 | 148551 | 128713 | 3625 | 2,82 |
| beta- ocimeno (E) | 23 | 78128 | 66027 | 81256 | 75137 | 8557 | 11,39 |
| meso-di acetato de 2,3-butabediol | 24 | 302756 | 325471 | 378492 | 335573 | 16062 | 4,79 |
| Acetofenona | 25 | 677322 | 654487 | 691313 | 674374 | 16147 | 2,39 |
| d,l-diacetato de 2,3-butanediol | 26 | 112855 | 125468 | 110211 | 116178 | 8919 | 7,68 |
| 3-etil-2,5-dimetil-pirazina | 27 | 1480711 | 1299875 | 1352781 | 1377789 | 127870 | 9,28 |
| tetrametil pirazina | 28 | 788574 | 770892 | 711549 | 757005 | 12503 | 1,65 |
| 2-nonanona | 29 | 305131 | 265891 | 312598 | 294540 | 27747 | 9,42 |
| 2-isopropil-5-metil-2-hexenal | 30 | 583033 | 628947 | 589346 | 600442 | 32466 | 5,41 |
| Bencenetanol | 31 | 718312 | 658921 | 625897 | 667710 | 41996 | 6,29 |
| trans Isomentona | 32 | 605375 | 513798 | 599671 | 572948 | 64755 | 11,30 |
| 2,3,5- trimetil-6-etil pirazina | 33 | 370730 | 408146 | 450713 | 409863 | 26457 | 6,46 |
| cis- Isomentona | 34 | 672260 | 613907 | 699872 | 662013 | 41262 | 6,23 |
| caprilato de etilo | 35 | 307086 | 275677 | 305189 | 295984 | 22210 | 7,50 |
| fenil acetato de etilo | 36 | 556278 | 580312 | 413828 | 516806 | 16995 | 3,29 |

| | | | | | | | |
|-----------------------------------|----|--------|--------|--------|--------|-------|------|
| 2-fenil-2-butenal | 37 | 168035 | 161781 | 142609 | 157475 | 4422 | 2,81 |
| 3-isopentil- 2,5-dimetil pirazina | 38 | 220911 | 225879 | 199875 | 215555 | 3513 | 1,63 |
| 5-metil-2-fenil-2-hexenal | 39 | 299139 | 271935 | 253431 | 274835 | 19236 | 7,00 |

Fuente: Esta investigación

Tabla 12. Resultados de la reproducibilidad del método

| Compuesto | Pico | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Promedio | S | Cv% |
|-----------------------------------|------|----------|----------|----------|----------|---------|-------|
| 2-propanol | 1 | 2491185 | 2820214 | 2606726 | 2639375 | 166927 | 6,32 |
| ácido acético | 2 | 13701998 | 15828828 | 14715340 | 14748722 | 1063808 | 7,21 |
| 3- metil butanal | 3 | 450312 | 507142 | 463654 | 473703 | 29718 | 6,27 |
| 2-metil butanal | 4 | 69713 | 79543 | 77055 | 75437 | 5111 | 6,77 |
| 3-hidroxi-2-butanona | 5 | 559895 | 600725 | 543237 | 567952 | 29579 | 5,21 |
| 2,3-butanediol | 6 | 719112 | 845942 | 732454 | 765836 | 69694 | 9,10 |
| 1,3-butanediol | 7 | 510154 | 586984 | 523496 | 540211 | 41052 | 7,60 |
| 2-metil-pirazna | 8 | 650895 | 777725 | 774237 | 734286 | 72239 | 9,84 |
| 2-furanmetanol | 9 | 145689 | 172519 | 159031 | 159080 | 13415 | 8,43 |
| 2-heptanol | 10 | 139537 | 176367 | 152879 | 156261 | 18646 | 11,93 |
| 2,5-dimetil-pirazina | 11 | 816712 | 943542 | 930054 | 896769 | 69659 | 7,77 |
| gamma butirolactona | 12 | 82255 | 99085 | 95597 | 92312 | 8883 | 9,62 |
| 2,3-dimetil-pirazina | 13 | 100213 | 127043 | 113555 | 113604 | 13415 | 11,81 |
| butanoato de etilo | 14 | 742399 | 949229 | 885741 | 859123 | 105953 | 12,33 |
| acetato de etilo | 15 | 854622 | 881452 | 967964 | 901346 | 59232 | 6,57 |
| benzaldehido | 16 | 395421 | 492251 | 408063 | 431912 | 52636 | 12,19 |
| 5-metil-furfural | 17 | 299572 | 326402 | 312914 | 312963 | 13415 | 4,29 |
| 2-etil-6-metil-pirazina | 18 | 231337 | 280167 | 286679 | 266061 | 30248 | 11,37 |
| 2-etil-5-metil-pirazina | 19 | 588716 | 735546 | 602058 | 642107 | 81195 | 12,65 |
| trimetil-pirazina | 20 | 951246 | 899876 | 999588 | 950237 | 49864 | 5,25 |
| acetato de sec butilo | 21 | 86118 | 100948 | 99460 | 95509 | 8167 | 8,55 |
| bencenacetaldhido | 22 | 148551 | 175381 | 161893 | 161942 | 13415 | 8,28 |
| beta- ocimeno (e) | 23 | 81256 | 100086 | 94598 | 91980 | 9684 | 10,53 |
| meso-di acetato de 2,3-butabediol | 24 | 378492 | 455322 | 391834 | 408549 | 41052 | 10,05 |
| acetofenona | 25 | 691313 | 879143 | 734655 | 768370 | 98349 | 12,80 |
| d,l-diacetato de 2,3-butanediol | 26 | 110211 | 137041 | 123553 | 123602 | 13415 | 10,85 |
| 3-etil-2,5-dimetil-pirazina | 27 | 1352781 | 1699611 | 1386123 | 1479505 | 191345 | 12,93 |
| tetrametil pirazina | 28 | 711549 | 798379 | 724891 | 744940 | 46758 | 6,28 |
| 2-nonanona | 29 | 312598 | 400428 | 385940 | 366322 | 47087 | 12,85 |
| 2-isopropil-5-metil-2-hexenal | 30 | 589346 | 616176 | 662688 | 622737 | 37109 | 5,96 |
| bencenetanol | 31 | 625897 | 742727 | 639239 | 669288 | 63949 | 9,55 |

| | | | | | | | |
|-----------------------------------|----|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| trans isomentona | 32 | 599671 | 646501 | 693013 | 646395 | 46671 | 7,22 |
| 2,3,5- trimetil-6-etil pirazina | 33 | 450713 | 577543 | 494055 | 507437 | 64465 | 12,70 |
| cis-isomentona | 34 | 699872 | 726702 | 793214 | 739929 | 48056 | 6,49 |
| caprilato de etilo | 35 | 305189 | 395019 | 348531 | 349580 | 44924 | 12,85 |
| fenil acetato de etilo | 36 | 413828 | 480658 | 427170 | 440552 | 35368 | 8,03 |
| 2-fenil-2-butenal | 37 | 142609 | 179439 | 155951 | 159333 | 18646 | 11,70 |
| 3-isopentil- 2,5-dimetil pirazina | 38 | 199875 | 226705 | 213217 | 213266 | 13415 | 6,29 |
| 5-metil-2-fenil-2-hexenal | 39 | 253431 | 299261 | 266773 | 273155 | 23572 | 8,63 |

Fuente: Esta investigación

Se puede observar que en la tabla 12, el valor del coeficiente de variación aumenta, respecto a la tabla 11 sin embargo los valores encontrados siguen cercanos al 12% que se permite para las técnicas estudiadas, este aumento se puede deber a variaciones en el equilibrio entre los compuestos y la fibra en espacio de cabeza, también a las variaciones en el proceso de pesar la muestra entre diferentes días.

4.4 Comparación de los perfiles aromáticos de los cacaos regionales (R-5 y R-6)

Para realizar la comparación de los compuestos identificados en los cacos regionales de diferentes días de fermentación R-5 y R-6 se seleccionó los compuestos comunes encontrados en las dos muestras, se encontró un total de 31 compuestos los cuales se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Compuestos comunes de las dos variedades de cacao regional R-5 y R-6

| Tiempo Retención | N° pico | IK E | IK T* | Promedio de Área | Compuestos identificados por GC-MS** |
|------------------|---------|------|-------|------------------|--------------------------------------|
| 2.531 | 1 | ---- | ----- | 214085 | 2,3-butanodiona |
| 3.261 | 2 | ---- | ----- | 20121700 | Ácido acético |
| 3.420 | 3 | ---- | ----- | 120133 | 2-metil butanal |
| 4.396 | 4 | 717 | 721 | 1677104 | 3-hidroxi-2-butanona |
| 5.238 | 5 | 743 | 741 | 125940 | 3-metil-1-butanol |
| 7.731 | 6 | 809 | 789 | 397481 | 2,3-butanediol |
| 8.310 | 7 | 817 | NR | 372584 | 1,3-butanediol |
| 13.104 | 8 | 890 | 874 | 1062407 | Acetato de isoamil |
| 13.253 | 9 | 893 | 877 | 176794 | Acetato de 2-metil-butanol |
| 13.899 | 10 | 903 | 892 | 364999 | 2-heptanona |

| | | | | | |
|--------|----|------|------|---------|---------------------------------|
| 14.833 | 11 | 921 | 906 | 744434 | 2-heptanol |
| 15.976 | 12 | 944 | 920 | 616011 | 2,3-dimetil-pirazina |
| 17.639 | 13 | 977 | 960 | 1826582 | Benzaldehído |
| 19.029 | 14 | 1005 | 991 | 247789 | Beta-Mirceno |
| 19.556 | 15 | 1018 | 1000 | 561790 | Trimetil pirazina |
| 21.054 | 16 | 1055 | 1037 | 195415 | Beta-Ocimeno |
| 21.212 | 17 | 1059 | NR | 828959 | Acetato de sec- butilo |
| 21.392 | 18 | 1064 | 1042 | 136514 | Bencen acetaldehído |
| 21.995 | 19 | 1079 | 1054 | 318446 | D,l-diacetato de 2,3-butandiol |
| 22.305 | 20 | 1087 | 1065 | 116664 | Acetofenona |
| 22.510 | 21 | 1092 | 1064 | 177245 | Meso-diacetato de 2,3-butandiol |
| 22.712 | 22 | 1097 | 1059 | 158218 | 2-acetil-pirrol |
| 23.023 | 23 | 1105 | 1086 | 5680439 | Tetrametil pirazina |
| 23.178 | 24 | 1110 | 1096 | 530607 | 2-nonanona |
| 23.646 | 25 | 1123 | 1089 | 824060 | Alfa.Terpinoleno |
| 24.362 | 26 | 1144 | 1113 | 763794 | Bencen etanol |
| 25.669 | 27 | 1182 | 1163 | 101609 | 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina |
| 26.794 | 28 | 1217 | 1197 | 219659 | Caprilato de etilo |
| 28.452 | 29 | 1270 | 1243 | 408798 | Fenil acetato de etilo |
| 28.849 | 30 | 1283 | 1255 | 979478 | Acetato de 2-fenil etilo |
| 29.419 | 31 | 1302 | 1279 | 196181 | 2-fenil-2-butenal |

Fuente: esta investigación

*Base de datos NIST y ADAMS ** Base de datos Wiley

Para determinar diferencias significativas entre las dos muestras de cacao se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple.

Tabla 14. Anova para área por compuesto

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 7,95315E14 | 30 | 2,65105E13 | 754,61 | 0,0000 |
| Intra grupos | 1,08907E12 | 31 | 3,51314E10 | | |
| Total (Corr.) | 7,96404E14 | 61 | | | |

La tabla 14, ANOVA, descompone la varianza de AREA en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 754,609, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que

0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de AREA entre un nivel de COMPUESTO y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se aplicó la prueba de múltiples rangos.

Tabla 15. Prueba de múltiples rangos para área por compuesto

Método: 95,0 porcentaje LSD

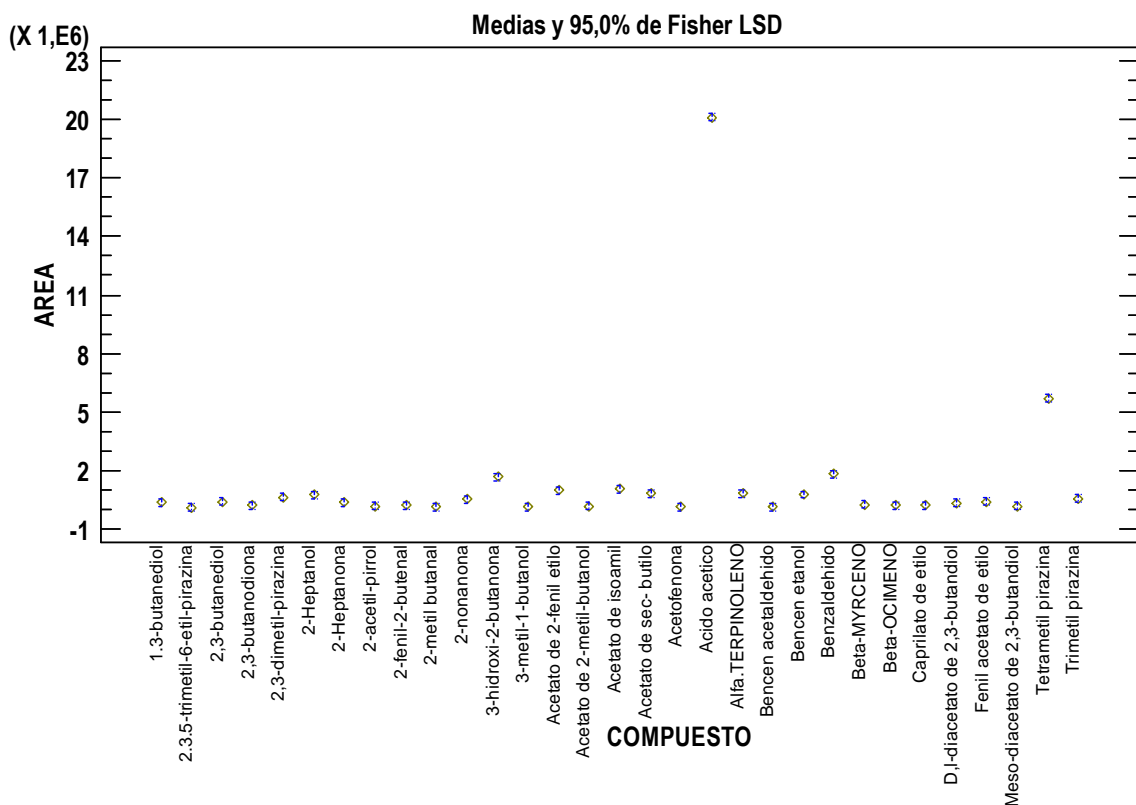
| COMPUESTO | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|---------------------------------|-------|-----------|-------------------|
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina | 2 | 101609 | X |
| Acetofenona | 2 | 116664 | X |
| 2-metil butanal | 2 | 120133 | X |
| 3-metil-1-butanol | 2 | 125940 | X |
| Bencen acetaldehído | 2 | 136514 | X |
| 2-acetil-pirrol | 2 | 158218 | XX |
| Acetato de 2-metil-butanol | 2 | 176794 | XX |
| Meso-diacetato de 2,3-butandiol | 2 | 177245 | XX |
| Beta-OCIMENO | 2 | 195415 | XXX |
| 2-fenil-2-butenal | 2 | 196181 | XXX |
| 2,3-butanodiona | 2 | 214085 | XXX |
| Caprilato de etilo | 2 | 219659 | XXX |
| Beta-MYRCENO | 2 | 247790 | XXXX |
| D,l-diacetato de 2,3-butandiol | 2 | 318446 | XXXX |
| 2-Heptanona | 2 | 364999 | XXXXX |
| 1,3-butanediol | 2 | 372584 | XXXXX |
| 2,3-butanediol | 2 | 397481 | XXXXXX |
| Fenil acetato de etilo | 2 | 408798 | XXXXXX |
| 2-nonanona | 2 | 530607 | XXXXXX |
| Trimetil pirazina | 2 | 561791 | XXXXX |
| 2,3-dimetil-pirazina | 2 | 616011 | XXXXX |
| 2-Heptanol | 2 | 744434 | XXXXX |
| Bencen etanol | 2 | 763794 | XXXX |
| Alfa –Terpinoleno | 2 | 824060 | XXX |
| Acetato de sec – butilo | 2 | 828959 | XXX |
| Acetato de 2-fenil etilo | 2 | 979478 | XX |
| Acetato de isoamil | 2 | 1,06241E6 | X |
| 3-hidroxi-2-butanona | 2 | 1,6771E6 | X |
| Benzaldehído | 2 | 1,82658E6 | X |
| Tetrametil pirazina | 2 | 5,68044E6 | X |
| Ácido acético | 2 | 2,01217E7 | X |

Se han identificado 12 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos compuestos que compartan una misma columna de X's. La tetrametil pirazina y el ácido acético presentan valores significativamente mayores que la media de cualquier otro compuesto. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este

método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

En el anexo G se muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 245 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

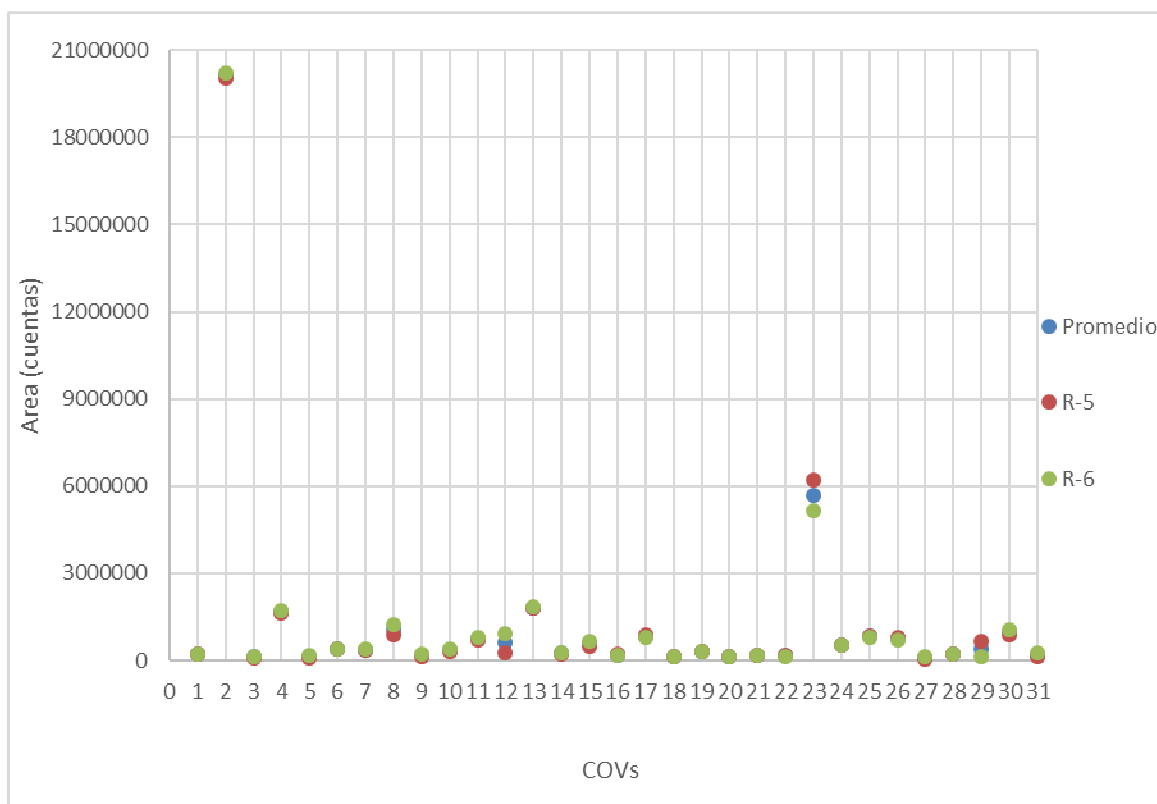
Gráfica 4. Gráfico de medias de área respecto a cada compuesto, por el método de LSD.



En la gráfica 4 se aprecia que el compuesto ácido acético y tetrametil pirazina no se traslapan con ningún otro compuesto, por lo tanto, presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a las medias de los otros compuestos con un 95% de nivel de confianza, además estos están en mayor concentración en las dos muestras de cacao regional, por lo que las características organolépticas están definidas principalmente por estos dos COVs.

En la gráfica 5 de dispersión de los COVs presentes en las muestras, se puede observar las diferencias que presentan algunos compuestos respecto a sus promedios de área.

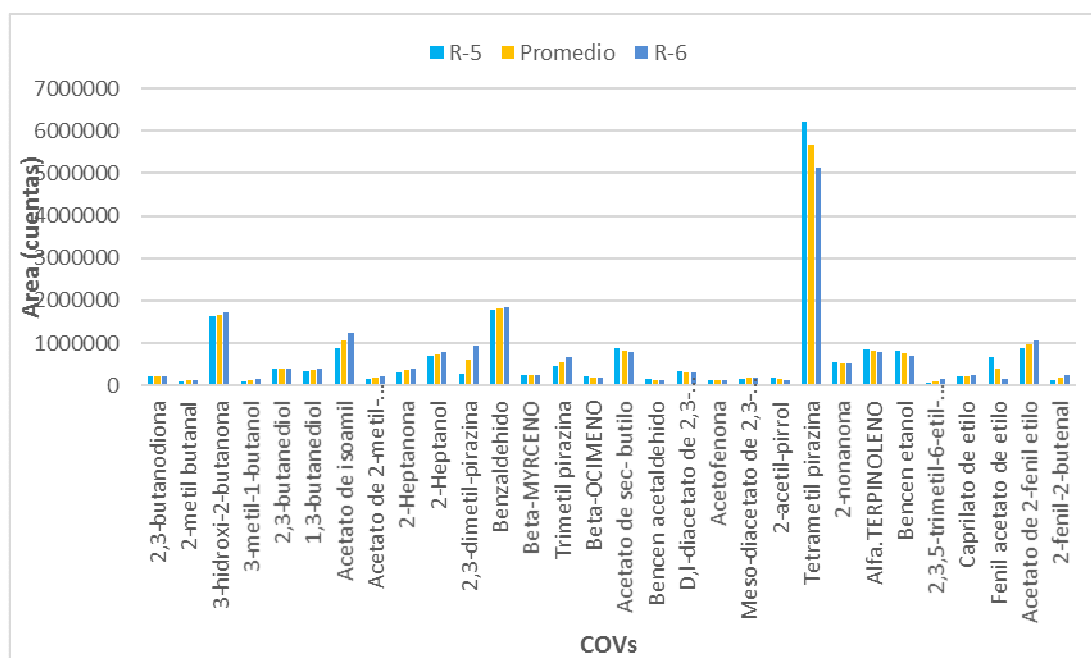
Gráfica 5. Variación de los COVs para la técnica de extracción HS-SPME en las muestras de cacao.



Fuente: esta investigación

En la anterior grafica se pudo observar que los compuestos 2 (ácido acético), 8 (acetato de isoamil), 12 (2,3-dimetil-pirazina), 23 (tetrametil pirazina) y 29 (fenil acetato de etilo) presentaron diferencias de área, donde existen incrementos y descensos de ésta con respecto al promedio de la técnica (HS-SPME). Siendo más importante para el compuesto 23 (tetrametil pirazina). Por otra parte, el resto de COVs no presentaron variación de áreas entre las dos muestras.

Gráfica 6. Comportamiento de los COVs en las muestras de cacao regional extraídos por HS-SPME y analizadas por GC-MS



Fuente: esta investigación

La grafica 6 permitió visualizar los COVs mayoritarios a excepción del ácido acético, puesto que su área equivale aproximadamente al 50% del área total en cada muestra, por lo cual se omitió del análisis. Teniendo en cuenta esto, se puede observar que la tetrametil pirazina es el compuesto con mayor área, seguido por el benzaldehído, 3-hidroxi-2-butanona, acetato de isoamil, acetato de 2-fenil-etilo y en casi igual proporción el bencen etanol, alfa-terpinoleno, acetato de sec-butilo y el 2-heptanol, éstos compuestos son de gran importancia puesto que se encuentran dentro de las familias de pirazinas, aldehídos-cetonas, esterés, alcoholes y terpenos; todos ellos aportan notas agradables en el aroma del cacao. El resto de compuestos no aportan valores significativos respecto al área. Ésta tendencia se observa en las dos muestras, por lo tanto, el hecho de que el cacao se fermente 5 o 6 días no genera variaciones respecto al perfil cromatográfico de los 9 COVs mayoritarios.

4.5 Comparación de los COVs entre las dos variedades de cacao (CCN51 y regional).

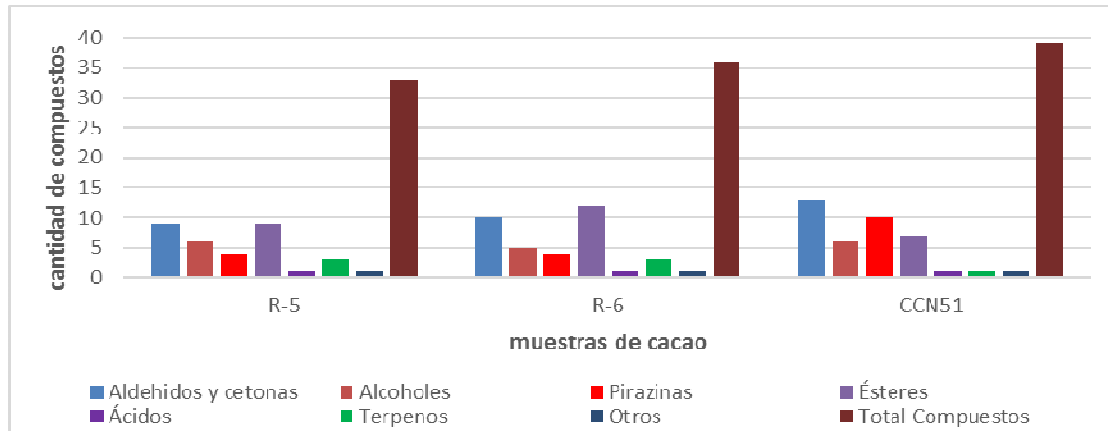
En las tablas 9 y 10 se presentaron los COVs obtenidos para los cacaos regionales (R-5 y R-6) agrupados por familia orgánica y las notas aromáticas producidas por cada compuesto. Por otra parte, la información sobre la identificación de los COVs para el CCN51 se detalla en la tabla 8. Con esta

información se puede apreciar las diferentes familias orgánicas que se emplearon para clasificar a los diferentes COVs y realizar una comparación de los compuestos por familia orgánica, estos compuestos han sido reportados como los responsables de producir notas odoríficas deseables como nuez, chocolate, floral y frutal e indeseables como vinagra, mohoso y quemado en el cacao fermentado, seco y tostado.^{106, 107}

4.5.1 Análisis de los COVs identificados por familia orgánica.

El comportamiento de los COVs identificados se muestra en la gráfica 7, en ésta se puede observar que para el cacao regional fermentado 5 días se identificaron 33 compuestos mayoritarios, para el cacao regional fermentado 6 días 36 compuestos y para el CCN51 fermentado por 9 días 39 compuestos, por lo que se puede apreciar que en esta investigación y para estas muestras de cacao analizadas, el tiempo de fermentación respecto a la cantidad de COVs extraídos presentan una relación directamente proporcional. Rodríguez encontró que la mayor cantidad de COVs se genera en 5 días de fermentación, después de ese tiempo la cantidad de compuestos aislados comienza a descender.¹⁰⁸ Por otra parte Cros encontró en su estudio que la mayor cantidad de compuestos se extrajeron a 4 días de fermentación.¹⁰⁹

Gráfica 7a. Evolución por grupo funcional del número de compuestos.



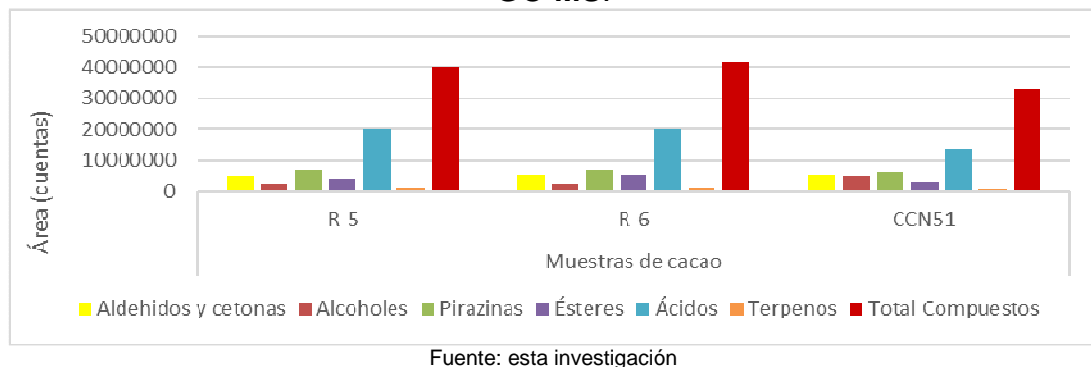
106 ACULEY P. et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of Food Science* 75: S300, S307. (2010).

107 FRAUENDORFER F. SCHIEBERLE P. "Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, p.10244-10251.2008

108 RODRÍGUEZ J. "Estudio de los compuestos volátiles de Theobroma cacao L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado". Director: María Eugenia Jaramillo Flores y Eugenia del Carmen Lugo Cervantes. Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional De Ciencias Biológicas, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. México, D.F., junio de 2011.

109 CROS, Op. Cit.

Gráfica 7b. Área generada por los compuestos volátiles identificados por GC-MS.



En la gráfica 7a se pudo observar que los aldehídos-cetonas, alcoholes, pirazinas y ésteres son las familias orgánicas con mayor cantidad de compuestos en las dos variedades de cacao. Se evidencia que en el cacao CCN51 hay un incremento de la cantidad de compuestos para aldehídos-cetonas y pirazinas y disminución para ésteres y terpenos; este fenómeno puede deberse al tiempo de fermentación al que se sometieron las muestras, los cacaos regionales se fermentaron en un tiempo de 5 a 6 días, mientras que el CCN51 se fermentó por 9 días. En cuanto a la familia de ácidos la cantidad permanece constante, puesto que en las dos variedades solo se identificó al ácido acético. Hay que tener en cuenta que la fermentación es una etapa muy importante en la formación de los COVs del cacao, porque es en este proceso donde se genera una fracción volátil de origen bioquímico y microbiológico que es cualitativa y cuantitativamente muy importante, Cros y Portillo mencionaron que la concentración de la fracción volátil total en el cacao bien fermentado y seco, fue 10 veces mayor que la del cacao no fermentado y seco, y además, presentó una mayor cantidad de compuestos volátiles.^{110,111} Por lo tanto, la fermentación es esencial para obtener productos derivados del cacao de excelente calidad aromática.

En la gráfica 7b se puede observar que el ácido acético es el compuesto que presenta la mayor concentración en las tres muestras de cacao, la producción de éste ácido se inicia durante la fermentación, donde se provoca la muerte del germen. Además, se lleva a cabo el metabolismo de los azúcares de la pulpa del cacao y se produce por síntesis bioquímica la oxidación de etanol,¹¹² donde su contenido puede seguir aumentando en los primeros días de secado, sin embargo, del secado al tostado su contenido puede disminuir debido a que se volatiliza.

110 CROS E. JEANJEAN N. Cocoa quality: effect of fermentation and drying. Plantations, recherche, développement. 24:25-27. 1995.

111 PORTILLO et. al. Aroma formation of criollo cocoa (Theobroma cacao L.) in function of the post harvest treatment in Venezuela. Revista Científica UDO Agrícola 9(2): 458-468. 2009.

112 SCHWAN RF., WHEALS AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44: 205-221. 2004.

Respecto al aroma éste compuesto le confiere al cacao notas a vinagre con intensidad baja. Afoakwa y Frauendorfer reportan al ácido acético como el compuesto con mayor actividad de olor* en el cacao fermentado, seco y tostado.^{113,114}

En esta investigación la mayor concentración se presenta en las muestras que se fermentaron en un periodo de 5 a 6 días con áreas de 20039362 cuentas y 20204038 cuentas respectivamente. A los 9 días se nota un descenso (Área de 13705248 cuentas), lo que concuerda con lo encontrado por Rodríguez, en su trabajo el mayor contenido de ácido se presentó a los 4 días de fermentación, después de ese tiempo la concentración disminuyo hasta los 8 días.¹¹⁵

Los alcoholes confieren al licor de cacao notas aromáticas florales, frutales y caramelo, por lo que deben formar parte de la fracción volátil del cacao que se genera durante la fermentación. Éstos son producidos por la degradación térmica de aminoácidos y por la reducción de aldehídos y cetonas.¹¹⁶ Los resultados de este trabajo indican que la concentración de alcoholes aumenta de las muestras fermentadas de 5 a 6 días áreas de 2413197 cuentas y 2441809 cuentas a la muestra fermentada por 9 días, con un área mayor de 4841998 cuentas. Esto se debe a que en el cacao CCN51 se genera el 2-propanol con una concentración que aporta de manera representativa, el cual le genera al cacao un aroma fuerte y poco agradable.

Por otra parte, el 3-metil-1-butanol, el cual es responsable de producir notas aromáticas a malta y chocolate¹¹⁷ no se generó en esta muestra, por lo que disminuye la calidad organoléptica a este clon. Otros alcoholes encontrados en las tres muestras fueron el bencenotanol, 2-heptanol y 2,3-butanediol los cuales generan notas deseables en el cacao.¹¹⁸

*La actividad de olor es la relación entre la concentración y el poder odorífico de un compuesto.

113 AFOAKWA EO, PATERSON A, FOWLER M, RYAN A. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chemistry* 113: 208,215. 2009

114 FRAUENDORFER F, SCHIEBERLE P. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5521-5529. 2006.

115 RODRIGUEZ J, ESCALONA HB, OROZCO I. et al.. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International* 44: 250-258. 2011.

116 SERRA-BONVEHÍ J. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology* 221: p.19-29.2005.

117 OBERPARLEITER S., ZIEGLEDER G. Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung A* 204: 156-160. 1997.

118 AFOAKWA EO, PATERSON A, FOWLER M, RYAN A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 1-18. 2008.

Los ésteres incrementaron su concentración de la muestra de 5 días de fermentación (área 4265046 cuentas) a la del sexto día (área 5403383 cuentas), misma que descendió en la muestra de 9 días de fermentación (área 2533365 cuentas).

Los ésteres están correlacionados con notas de aroma frutal, siendo el grupo más importante de los compuestos volátiles después de las pirazinas en el grano de cacao tostado.¹¹⁹ Ésteres identificados en este estudio incluyen al fenil acetato de etilo, compuesto que es el resultado de la esterificación del alcohol feniletílico, que genera notas agradables al cacao y su concentración decrece al aumentar los días de fermentación en las muestras. Por otra parte, el contenido del acetato 2-fenil etilo solo se presentó en las muestras de cacao regional. En el cacao CCN51 hay ausencia de este compuesto y su producción puede ser el resultado del metabolismo de las levaduras en el proceso de fermentación lo cual produce aromas clave en el cacao, tales como son las notas de miel y floral.¹²⁰ Teniendo en cuenta los resultados para estos dos ésteres se puede afirmar que el cacao regional presenta mejor calidad aromática respecto al CCN51. Esteres comunes en las tres muestras son el acetato de sec-butilo, el caprilato de etilo y los isómeros meso y D, L–diacetato de 2,3-butanediol; éste último no aporta aroma al cacao. Pero el acetato y caprilato generan notas frutales agradables.

En lo que respecta a la familia de las pirazinas son uno de los grupos de compuestos volátiles más importantes en el cacao tostado. Serra-Bonvehí, mencionaron que las pirazinas aportaron el 40% del aroma del cacao tostado. Se puede observar que las pirazinas presentan una concentración relativamente estable sin cambios significativos entre las muestras. La tetrametil pirazina ha sido reportada por diversos investigadores por producir notas características a cacao y café tostado, lo que hace a esta pirazina deseable en el cacao y sus derivados.¹²¹ Los resultados de esta investigación indicaron que el contenido para esta pirazina fue muy significativo para el cacao regional siendo después del ácido acético el que presentó mayor abundancia. En cambio, en el CCN51 esta pirazina presentó una concentración baja, por lo tanto, el cacao regional presenta mejores características organolépticas. Otras pirazinas importantes fueron la 2,3-dimetil-pirazina, trimetil pirazina y 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina. La 2,3-dimetilpirazina es originada por procesos térmicos, la tetrametil pirazina y trimetil pirazina fueron reportadas como compuestos de origen microbiológico al final de la fermentación por *Bacillus subtilis* y *B. Megatrium*.¹²²

119 JINAP S. et. al. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during in broasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). Journal of the Science of Food Agriculture 77: p. 441-448. 1998.

120 Aculey et al. 2010. Op. Cit.

121 SERRA BONVEHÍ. 2005. Op. Cit.

122 HASHIM P., JINAP S., MUHAMMAD SKS, ALI A. Effect of drying time bean depth and temperature on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentrations of Malaysian cocoa beans. Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 987-994. 1999.

Por su parte, los aldehídos y cetonas presentaron una concentración constante en las tres muestras. Durante el procesamiento del cacao los aldehídos presentan dos principales orígenes: bioquímico (fermentación) y térmico (secado y tostado).¹²³ Aldehídos importantes que contribuyen a la calidad aromática del cacao son el 2-metil-butanal y el 3-metil-butanal ellos son formados a partir de los aminoácidos (isoleucina y leucina) por las bacterias ácido lácticas en la fermentación del cacao, los cuales producen notas a malta y chocolate en el cacao fermentado, seco y tostado.¹²⁴ En las tres muestras analizadas hay un contenido bajo del 2-metil-butanal y solo en el cacao CCN51 hay una concentración importante del 3-metil-butanal, por lo que la calidad organoléptica de este cacao podría mejorar con la presencia de éste compuesto. Una cetona importante presente en este estudio fue la 3-hidroxi-2-butanona; ésta cetona se produce durante la fermentación alcohólica a partir de piruvato y butanodiol, además es un precursor de la tetrametilpirazina.¹²⁵

Otros compuestos identificados y que tuvieron un aporte significativo en el aroma de las muestras analizadas fueron la 2,3-butanediona, acetofenona, benzaldehído y 2- nonanona; dichos compuestos generan notas aromáticas florales, dulces y a mantequilla. Una alta concentración de compuestos de aldehídos y cetonas es favorable para una buena calidad del cacao, produciendo notas frutales y florales.¹²⁶ Por último, la familia de los terpenos presentó un mínimo aporte en la concentración aromática en las muestras de cacao, siendo el beta-ocimeno el común para los tres, éste compuesto le confiere al cacao notas agradables.

4.5.2 Determinación de diferencias significativas entre las muestras.

El análisis estadístico llevado a cabo para determinar si hay o no diferencias entre las tres muestras de cacao se hizo a través de una comparación de varias muestras. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 16. Anova para área por familia orgánica

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 6,37785E14 | 6 | 1,06298E14 | 40,83 | 0,0000 |
| Intra grupos | 3,64437E13 | 14 | 2,60312E12 | | |
| Total (Corr.) | 6,74229E14 | 20 | | | |

123 Portillo et al. 2009. Op. Cit.

124 SCHNERMANN P., SCHIEBERLE P. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 867-872. 1997.

125 PRETORIUS IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 16: 675-729. 2000.

126 Serra-Bonvehí. 2005. Op. Cit.

La ANOVA (Tabla 16) descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos.

La razón-F, que en este caso es igual a 40,8346, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las áreas de las 7 familias orgánicas con un nivel del 95,0% de confianza.

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la prueba de múltiples rangos.

Tabla 17. Pruebas de Múltiple Rangos para áreas por familias orgánicas

Método: 95,0 porcentaje LSD

| <i>familia orgánica</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| otros | 3 | 132084, | X |
| Terpenos | 3 | 1,0953E6 | XX |
| Alcoholes | 3 | 3,23233E6 | XX |
| Ésteres | 3 | 4,06726E6 | XX |
| Aldehídos y cetonas | 3 | 5,21113E6 | XX |
| Pirazinas | 3 | 6,63198E6 | X |
| Ácidos | 3 | 1,79829E7 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|---------------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| Alcoholes - Aldehídos y cetonas | | -1,9788E6 | 2,82544E6 |
| Alcoholes – Pirazinas | * | -3,39965E6 | 2,82544E6 |
| Alcoholes – Terpenos | | 2,13704E6 | 2,82544E6 |
| Alcoholes – otros | * | 3,10025E6 | 2,82544E6 |
| Alcoholes – Ácidos | * | -1,47505E7 | 2,82544E6 |
| Alcoholes – Ésteres | | -834930 | 2,82544E6 |
| Aldehídos y cetonas - Pirazinas | | -1,42085E6 | 2,82544E6 |
| Aldehídos y cetonas - Terpenos | * | 4,11583E6 | 2,82544E6 |
| Aldehídos y cetonas – otros | * | 5,07905E6 | 2,82544E6 |
| Aldehídos y cetonas – Ácidos | * | -1,27718E7 | 2,82544E6 |
| Aldehídos y cetonas – Ésteres | | 1,14387E6 | 2,82544E6 |
| Pirazinas – Terpenos | * | 5,53669E6 | 2,82544E6 |
| Pirazinas – otros | * | 6,4999E6 | 2,82544E6 |
| Pirazinas – Ácidos | * | -1,13509E7 | 2,82544E6 |
| Pirazinas – Ésteres | | 2,56472E6 | 2,82544E6 |
| Terpenos – otros | | 963213 | 2,82544E6 |
| Terpenos – Ácidos | * | -1,68876E7 | 2,82544E6 |

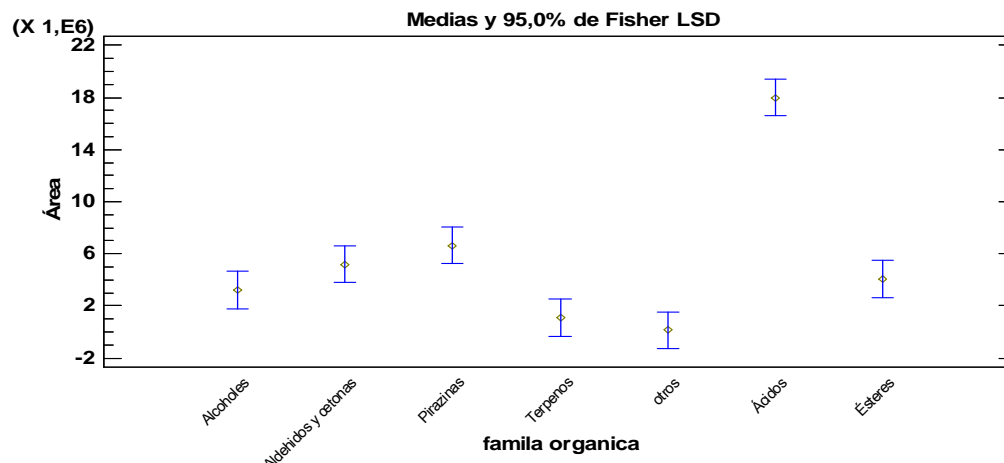
| | | | |
|--------------------|---|------------|-----------|
| Terpenos – Ésteres | * | -2,97197E6 | 2,82544E6 |
| otros – Ácidos | * | -1,78508E7 | 2,82544E6 |
| otros – Ésteres | * | -3,93518E6 | 2,82544E6 |
| Ácidos – Ésteres | * | 1,39156E7 | 2,82544E6 |

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 14 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

En la tabla 17, se han identificado 5 grupos homogéneos; las familias orgánicas otros y terpenos no presentan diferencias significativas en sus medias, así mismo entre terpenos y alcoholes no existen diferencias significativas, tampoco lo hacen alcoholes, ésteres, aldehídos-cetonas y las familias de ésteres, aldehídos-cetonas y pirazinas. Por otra parte, para la familia orgánica de los ácidos existen diferencias significativas en sus medias. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Gráfica 8. Medias de área por cada familia orgánica, por el método de LSD.



En el gráfico anterior se puede observar que la familia orgánica correspondiente a los ácidos no se traslapa con ninguna otra familia orgánica, por lo que existe diferencias estadísticamente significativas respecto a las medias de las otras familias. Esto es evidente ya que el ácido acético es el compuesto mayoritario en las tres muestras estudiadas.

4.6 Principales compuestos comunes y mayoritarios responsables del aroma en las diferentes muestras de cacao.

Para realizar el análisis correspondiente a las características organolépticas de cada muestra de cacao, se tomaron los 16 compuestos mayoritarios comunes y que aportan aroma significativamente según lo reportado por la literatura, en la tabla 18 se presentan estos COVs.

Tabla 18. Compuestos mayoritarios responsables del aroma.

| AREAS | | | COMPUESTO | NOTA PRODUCIDA ¹²⁷ |
|----------|----------|----------|--------------------------------|--|
| R-5 | R-6 | CCN51 | | |
| 20039362 | 20204038 | 13705248 | Ácido Acético | Vinagre |
| 6222763 | 5138116 | 757005 | Tetrametil Pirazina | Chocolate |
| 1799788 | 1853375 | 366276 | Benzaldehído | Dulce-Cereza-Almendra amarga |
| 1636472 | 1717735 | 564419 | 3-Hidroxi-2-Butanona | Dulce-Mantequilla-Crema |
| 873046 | 784872 | 88085 | Acetato De Sec-Butilo | Solvente-Banana |
| 816167 | 711420 | 667710 | Bencen Etanol | Floral-Rosas-Agua de rosas |
| 710878 | 777990 | 138762 | 2-Heptanol | Fresco-Herbal-Dulce-Floral-Frutas Verdes |
| 666653 | 150943 | 516806 | Fenil Acetato De Etilo | Dulce-Floral- Miel-Rosa-Cacao |
| 541843 | 519370 | 294540 | 2-Nonanona | Coco-Herbal-Dulce-Frutar-Queso |
| 467582 | 655999 | 880051 | Trimetil Pirazina | Nuez-Cacahuete |
| 397413 | 397549 | 709482 | 2,3-Butanediol | Frutar-Cebolla |
| 289098 | 942924 | 98232 | 2,3-Dimetil-Pirazina | Caramelo-Chocolate |
| 203184 | 236134 | 295984 | Caprilato De Etilo | Afrutado- Vino-Dulce-Albaricoque-Brandy-Pera |
| 137174 | 255187 | 157475 | 2-Fenil-2-Butenal | Chocolate tostado |
| 117992 | 115335 | 674374 | Acetofenona | Coco-Herbal-Dulce-Frutar-Queso |
| 59717 | 143501 | 409863 | 2,3,5-Trimetil-6-Etil-Pirazina | Caramelo |

Fuente: esta investigación

Para determinar si existen o no diferencias significativas respecto a los 16 compuestos mayoritarios presentes en las tres variedades de cacao se realizó por medio de una comparación de varias muestras.

Tabla 19. Anova para área por compuestos

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 8,70389E14 | 15 | 5,80259E13 | 38,57 | 0,0000 |
| Intra grupos | 4,81363E13 | 32 | 1,50426E12 | | |
| Total (Corr.) | 9,18525E14 | 47 | | | |

¹²⁷ Características organolépticas. Base de datos en línea. [Citado agosto 2016]. Disponible en: <http://www.thegoodscentscompany.com/search3.php?qName=Phenylacetate&submit.x=0&submit.y=0>

La ANOVA (Tabla 19) descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 38,5744, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos.

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las áreas de los 16 compuestos mayoritarios responsables del aroma con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la prueba de múltiples rangos.

Tabla 20. Prueba de múltiples rangos para área por compuestos

Método: 95,0 porcentaje LSD

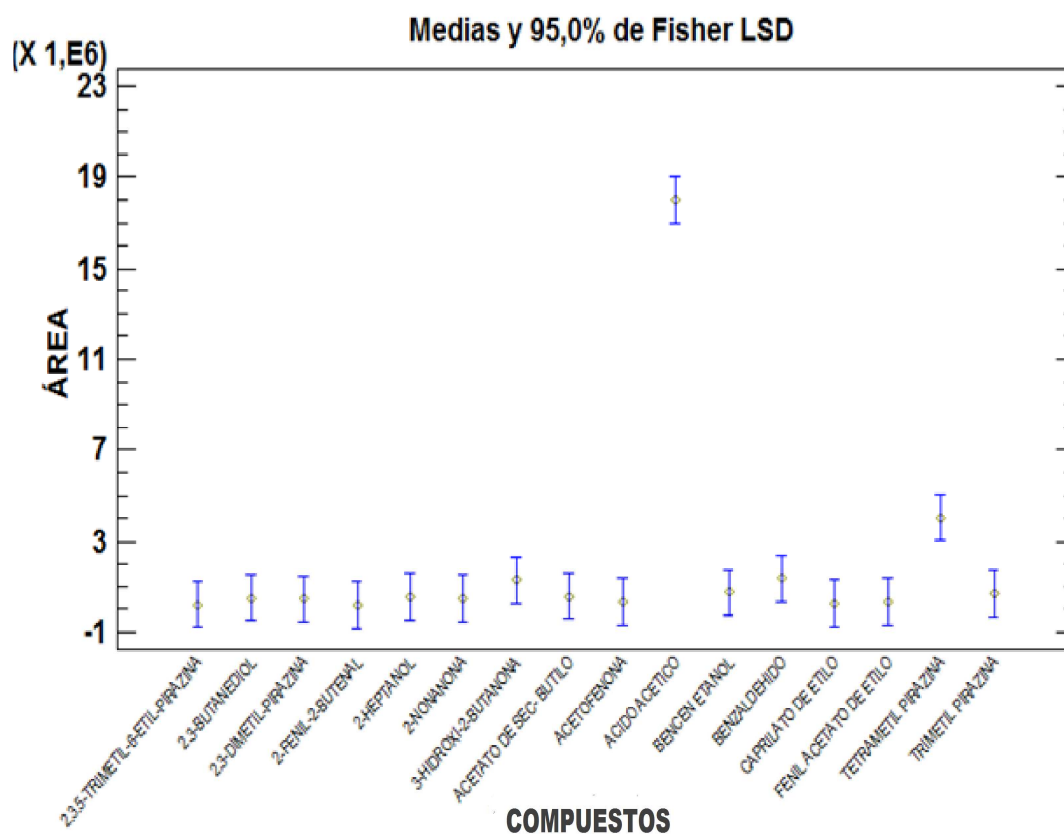
| COMUESTOS | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------------------------|-------|-----------|-------------------|
| 2-Fenil-2-Butenal | 3 | 183279, | X |
| 2,3,5-Trimetil-6-Etil-Pirazina | 3 | 204360, | X |
| Caprilato De Etilo | 3 | 245101, | X |
| Acetofenona | 3 | 302567, | X |
| Fenil Acetato De Etilo | 3 | 319846, | X |
| 2,3-Dimetil-Pirazina | 3 | 443418, | X |
| 2-Nonanona | 3 | 451918, | X |
| 2,3-Butanediol | 3 | 501481, | X |
| 2-Heptanol | 3 | 542543, | X |
| Acetato De Sec- Butilo | 3 | 582000, | X |
| Trimetil Pirazina | 3 | 667877, | X |
| Bencen Etanol | 3 | 731766, | X |
| 3-Hidroxi-2-Butanona | 3 | 1,30621E6 | X |
| Benzaldehído | 3 | 1,33981E6 | X |
| Tetrametil Pirazina | 3 | 4,03929E6 | X |
| Ácido Acético | 3 | 1,79829E7 | X |

En la tabla 20 se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas de las medias entre los primeros 14 compuestos, pero si para la tetrametil pirazina y el ácido acético, siendo la diferencia mucho mayor para éste último. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

En el anexo H se muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 29 pares indica que estos pares

muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

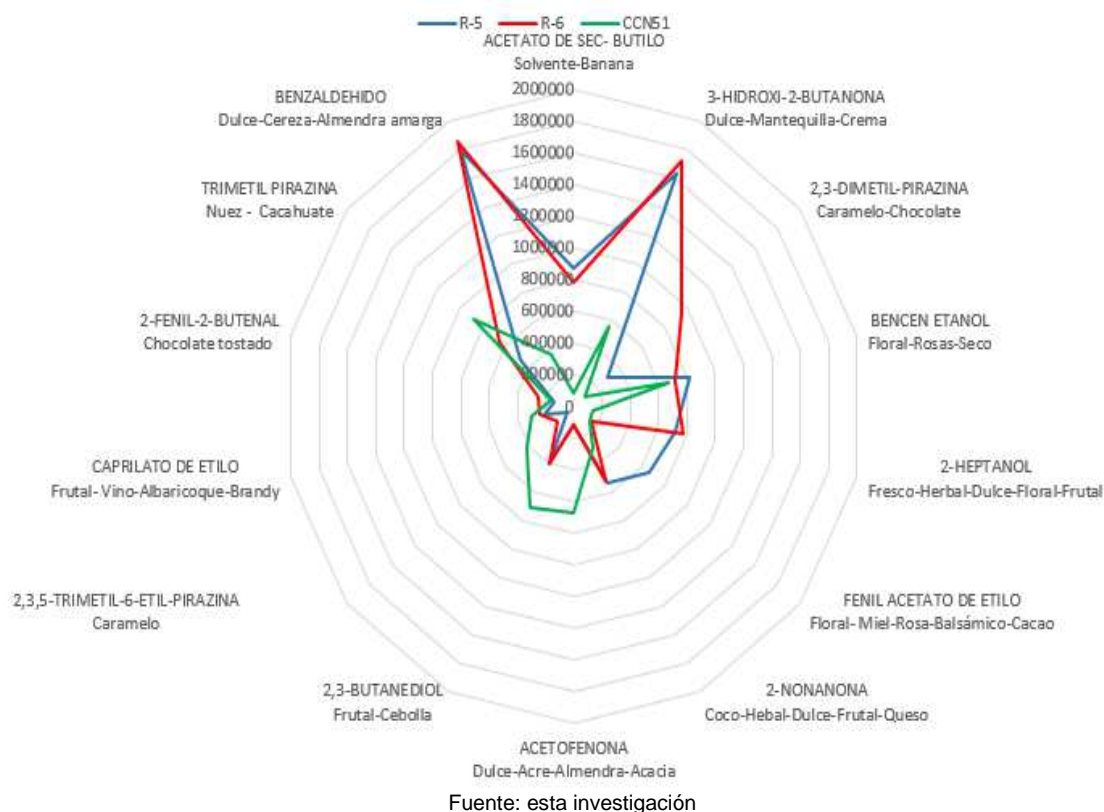
Gráfica 9. Medias de área por cada compuesto mayoritario, por el método de LSD.



En la gráfica 9 se puede observar que el ácido acético y la tetrametil pirazina no se traslapan con ningún otro compuesto, por lo tanto, existen diferencias estadísticamente significativas respecto a las medias de los otros 14 compuestos.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se evaluó los perfiles organolépticos de los 14 compuestos mayoritarios que no presentaron diferencias estadísticamente significativas, para observar sus variaciones en las tres muestras de cacao, esto se puede apreciar mejor en la gráfica 10.

Gráfica 10. Perfiles Organolépticos de las tres Muestras de Cacao.



En la gráfica 10 se puede observar que el cacao CCN51 presente concentraciones bajas en la mayoría de compuestos a excepción del 2,3-butanediol, 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina y trimetil pirazina. En estos tres compuestos su concentración es mayor respecto al regional. Por otra parte, las dos muestras correspondientes al cacao regional (R-5 y R-6), presentan una tendencia similar en la mayoría de compuestos, exceptuando al fenil acetato de etilo donde su área es mayor para el R-5 y la 2,3-dimetil-pirazina donde la mayor área corresponde al R-6.

4.7 Fragmentaciones de algunos COVs

A continuación, se presentan los espectros de masas y las fragmentaciones de las principales señales de un representante de cada una de las 5 familias químicas que aportan en las características organolépticas de las tres muestras de cacao.

Figura 3. Espectro de masas y fragmentaciones del benzaldehído

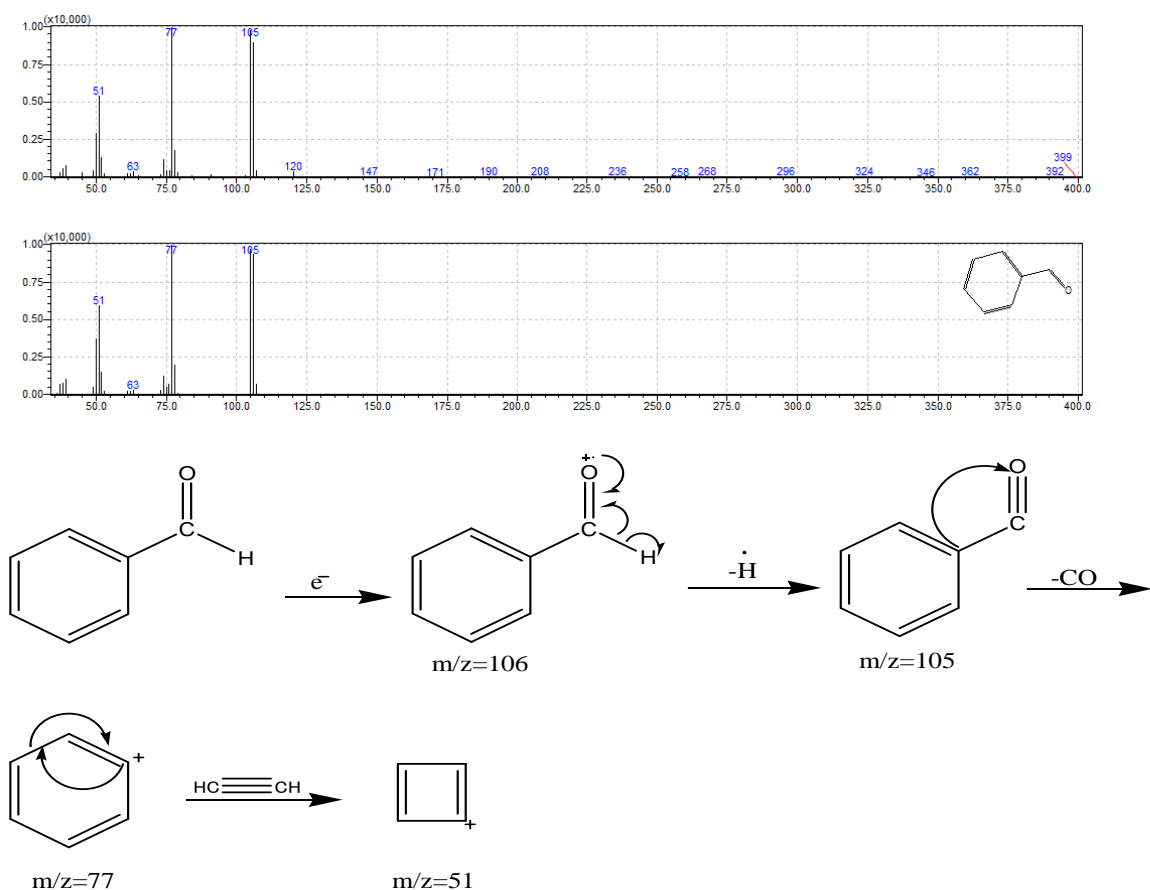
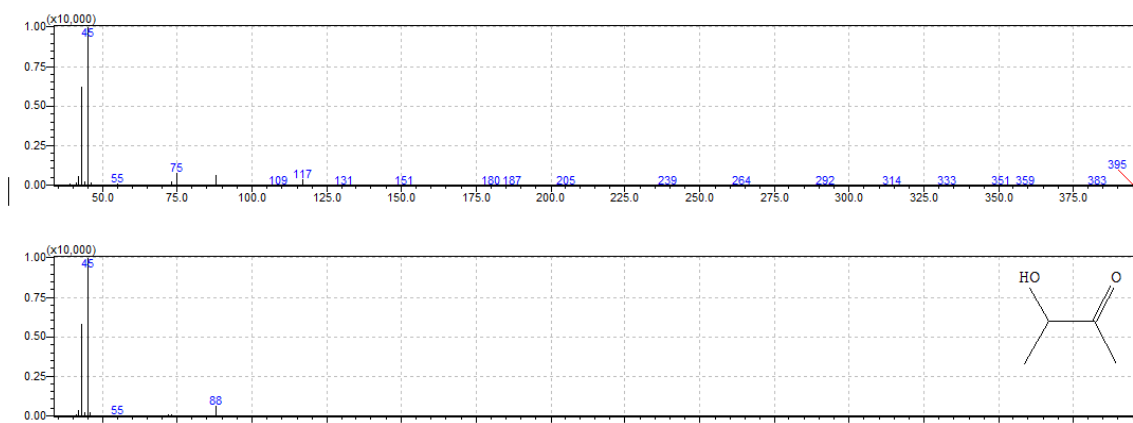


Figura 4. Espectro de masas y fragmentaciones de la 3-hidroxi-2-butanona



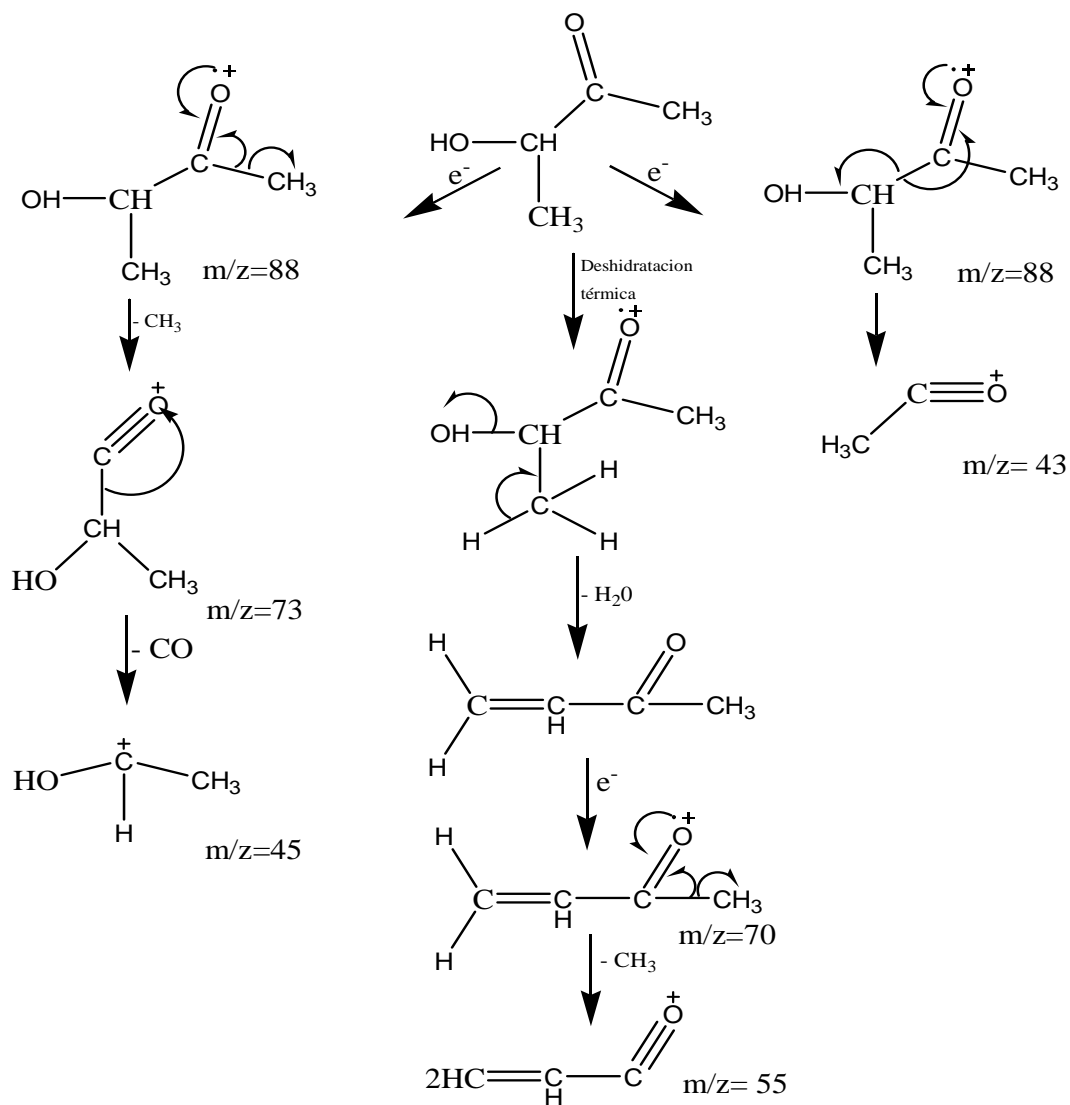
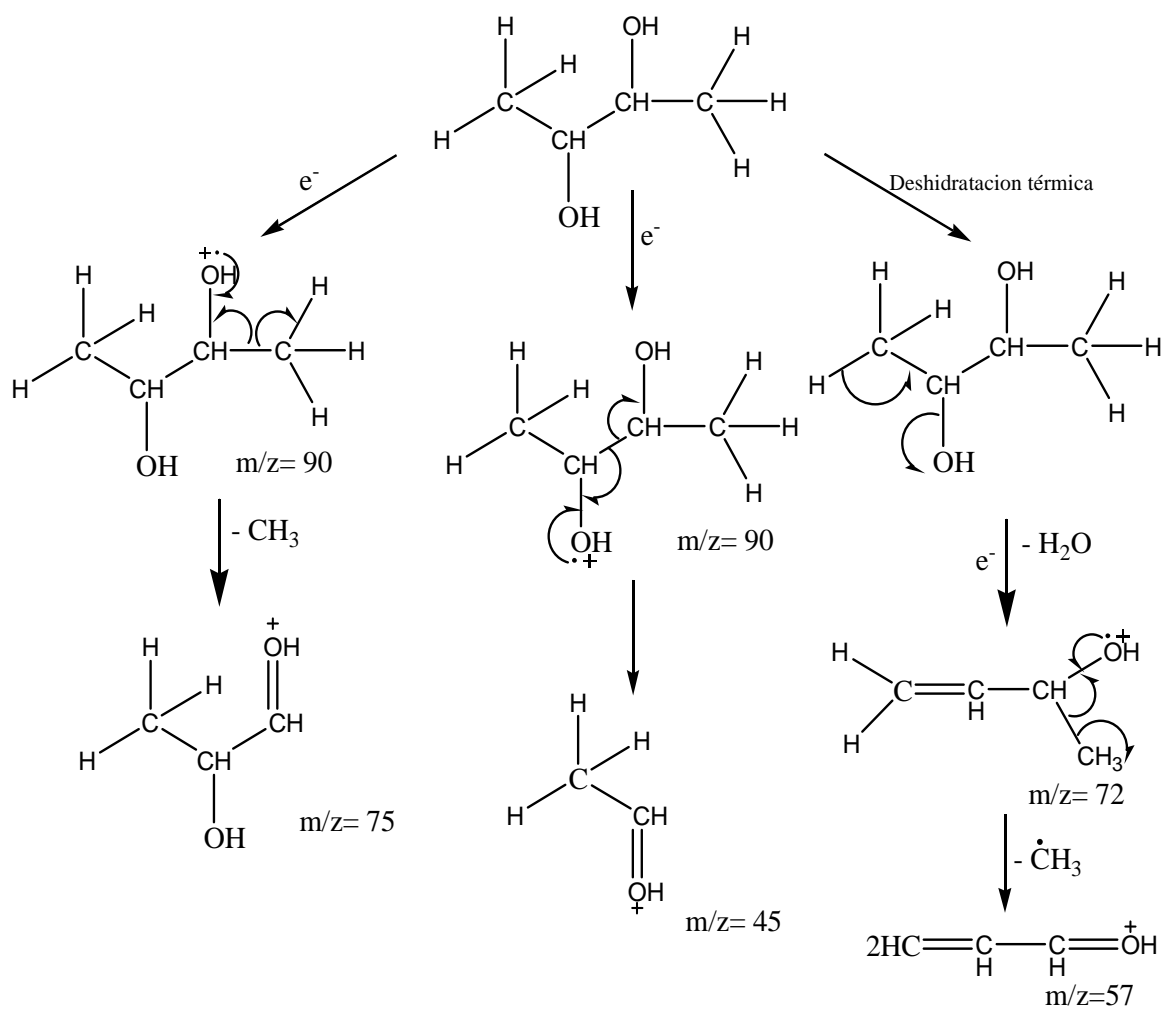
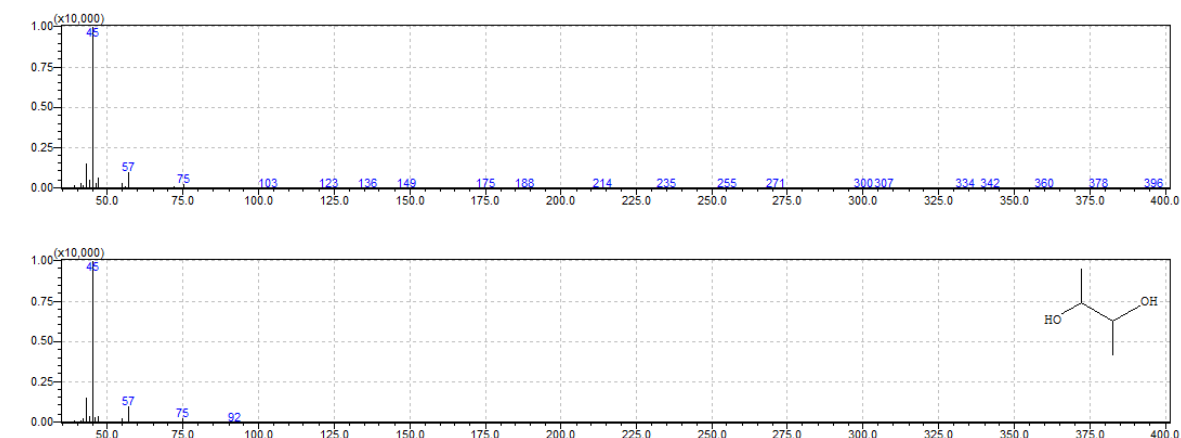
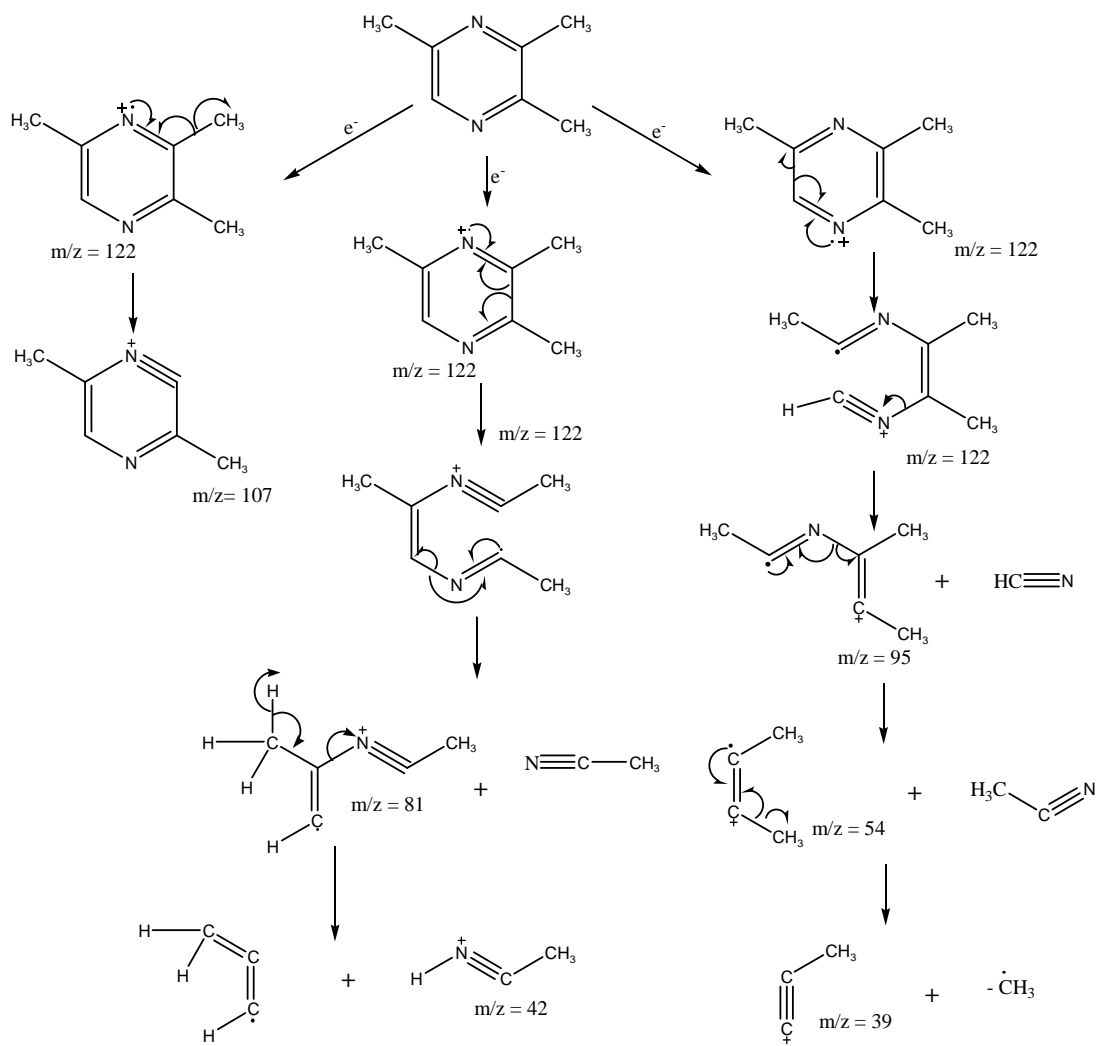
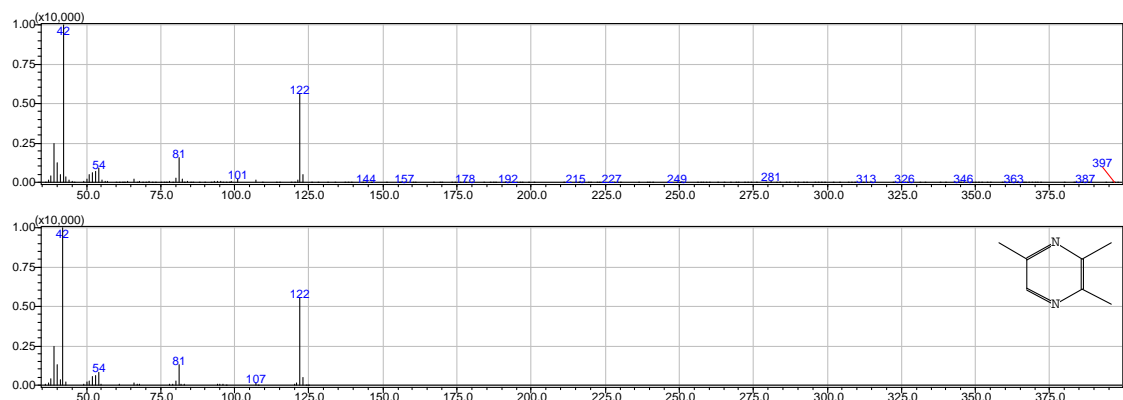


Figura 5. Espectro de masas y fragmentaciones del 2,3-butanediol



[illegible]

Figura 7. Espectro de masas y fragmentaciones de la trimetil pirazina



CONCLUSIONES

El estudio realizado permitió identificar las condiciones óptimas para la técnica de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) utilizando una muestra de licor de cacao CCN51 como muestra de referencia, el análisis realizado mediante un diseño experimental de superficie de respuesta determinó que de las variables estudiadas las condiciones óptimas fueron de 50 minutos de tiempo de extracción a una temperatura de 60°C y la mejor fibra fue la DVB/CAR-PDMS.

Utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se logró identificar los compuestos mayoritarios en tres diferentes muestras de licor de cacao, para el cacao regional fermentado por 5 días se identificaron un total de 33 COVs, para el cacao regional fermentado 6 días se identificaron 36 COVs y en el cacao CCN51 fermentado por 9 días 39 COVs, por lo que se pudo apreciar que la fermentación fue una etapa importante para la identificación de los COVs, puesto que en esta investigación la relación entre los días de fermentación y la cantidad total de compuestos identificados presento una tendencia directamente proporcional.

Las familias orgánicas que contribuyeron con la mayor cantidad de compuestos responsables del aroma fueron los aldehídos-cetonas y esteres; pero el grupo que presentó mayor área fue el grupo de los ácidos y pirazinas.

En la comparación de las dos muestras de cacao regional (R-5 y R6), los compuestos más abundantes y comunes fueron el ácido acético, la tetrametil pirazina, el benzaldehído, 3-hidroxi-2-butanona, acetato de isoamil y acetato de 2-fenil-etilo, todos ellos aportando notas aromáticas agradables al cacao, por otra parte, los compuestos diferentes con mayor concentración fueron el butanal, acetato de etilo, acetato de 2-pentanol para el cacao R-6 y el 2-pentanol en el R-5.

El perfil organoléptico de las muestras de cacao estuvo condicionada a la presencia o ausencia de algunos compuestos específicos. En el cacao CCN51 el 2-propanol fue el compuesto con mayor área después del ácido acético, éste alcohol proporciona un aroma fuerte y poco agradable. En cambio, en el cacao regional el compuesto más abundante después del ácido acético fue la tetrametil pirazina, éste compuestos otorga al cacao notas características a cacao y café tostado; por lo tanto, el cacao regional presento mejores características organolépticas respecto al cacao CCN51.

RECOMENDACIONES

Es necesario continuar las investigaciones sobre el desarrollo del aroma del cacao regional, teniendo como base los resultados obtenidos en este trabajo; se pueden evaluar muestras provenientes de otras fincas, otras épocas de año, para determinar las variaciones que aportan estas variables en el perfil organoléptico del cacao.

El tiempo y condiciones de fermentación, secado y tueste del cacao son factores determinantes en las características del aroma final, por lo que se debería realizar un análisis más profundo considerando las variables anteriormente expuestas, para así estandarizar el proceso de post cosecha y lograr una mayor eficiencia en su producción.

Realizar la optimización de los parámetros cromatográficos, evaluando factores como el tiempo de desorción, tipo de columna y rampas de calentamiento, para precisar qué condiciones mejoran los perfiles cromatográficos.

Se recomienda el uso de estándares de los compuestos identificados para complementar el estudio determinando la exactitud del método.

BIBLIOGRAFIA

ACULEY P. et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of Food Science* 75: S300, S307. (2010).

ADAMS R. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Baylor university. 2004.

AFOAKWA E. Chocolate Science and Technology. University of Ghana, Legon – Accra. Ghana. New Delhi, India. p. 13. 2010.

AFOAKWA EO, PATERSON A, FOWLER M, Ryan A. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chemistry* 113: 208,215. 2009

ALVARADO M. et al. Sustancias aromáticas en el cacao cosechado en la zona de rio anus, municipio Sucre, estado portuguesa, Venezuela. 2014.

ÁLVAREZ A. Aislamiento, purificación e identificación de los principios tóxicos alcaloídicos en plantas del género crotalaria y alimento contaminado para aves. UIS. Bucaramanga, p. 135. 2004.

ALVAREZ C et al. Identificación de los compuestos aromáticos en el cacao criollo de Venezuela usando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases. *Vitae*, vol. 19, núm. 1. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2012. p. 370-372.

AMORES F. et al. "Project to establish the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate fine or flavour and bulk cocoa". (2007). Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quevedo – Ecuador.

ANECACAO, Origen del Cacao en el Ecuador: Características de los Cacaos Finos y Ordinarios, Primera Edición, Quito-Ecuador, 2004.

A. P. Cromatografía gaseosa. p.18. [Citado agosto 2014] disponible en Internet: www.bilbo.edu.uy/~planta/pdf/GC.doc.

ARGUELLO, O.; MEJÍA, A. & PALENCIA, G. Clasificación de especies cultivares de *Theobroma cacao* L. para el mejoramiento del sistema de multiplicación de cacao. Corpoica – Colombia. p. 11. 2000.

BASTIDAS A. "Estudio Químico De Los Componentes Volátiles (HS-SPME) Y Análisis De La Composición De Taninos Y Cafeína En Un Tipo De Café Tostado Y Molido Tradicional Colombiano". San Juan de Pasto. 2010. Tesis de grado (Químico). Universidad de Nariño, programa de Química.

BECKETT S. The Science of Chocolate. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK. 2008.

BIN HASNY M. Optimisation of cocoa bean roasting conditions based on the development of flavor compound. Thesis, facultu of applied science, university technology MARA. 2012. p. 27-28.

BRITO E et al. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. Journal of Science of Food and Agriculture 81, (2000) p.281-288.

CALA R. Las voces prehispanas cacao, cacahuete y maíz en diccionarios generales de lengua castellana, catalana e italiana del siglo XX". Boletín Americanista, 51, p. 25-41.2001.

CALDERÓN L., "Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad". Tesis de Lic. En Química, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito – Ecuador, 2002.

Características organolépticas. Base de datos en línea. [Citado agosto 2016]. Disponible en: <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1028161.html>

COSTA F. PARREIRA C. Comparison of Two SPME Fibers for Differentiation of Coffee by Analysis of Volatile Compounds. Chromatographia.

CROS. "Factores condicionantes de la calidad del cacao". Memorias del primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. (2000) Venezuela.

DELGADO B. "Compuestos carbonílicos en muestras de interés medioambiental y agroalimentario. Capítulo IV: Determinación de compuestos carbonílicos mediante SPME-HPLC." Ciencias y Tecnologías 7. p.230. 2009.

DIAZ S. PINOARGOTE M. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir del cacao CCN51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Guayaquil, Ecuador, 2012. Tesis de grado (ingenieros de alimentos). Escuela superior politécnica del litoral. Facultad en mecánica y ciencias de la producción. p. 26-28.

DIMICK P. S. and J. M. Chemico-physical aspects of chocolate processing. A review. Can. Inst. Food Sci. Technol. 14 (4): (1981) p. 269-282.

DUCKI S. et al. "Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the head space analysis of volatile compounds in cocoa products ". Science Direct. Talanta 74 (2008) p.1166-1174.

FEATHER M. S. Amine-assisted sugar dehydration reactions, in C. Eriksson (ed), Maillard Reactions in Food: Chemical, Physiological and Technological Aspects, Vol. 5, Pergamon Press, Oxford, 1981.

FEDECACAO. Materiales de cacao en Colombia su compatibilidad sexual y modelos de siembra. Documentos técnicos. p. 12. Bucaramanga. 2009.

FRAUENDORFER F, SCHIEBERLE P. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: (2006) p.5521-5529.

FRAUENDORFER F. SCHIEBERLE P. "Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, p.10244-10251.2008.

GARCÍA P. et al. Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. Journal of Food Engineering 79: (2007) p.1159-1165.

GILCES H. SANMARTIN F. Análisis y selección de proceso de secado de cacao y diseño de prototipo de una unidad secadora tipo plataforma. Tesis de pregrado. Universidad estatal de milagro, unidad académica ciencias de la ingeniería. Ecuador. 2013.

GILL M.; A. J. MacLeod and M. Moreau. Aroma components of cocoa beans proceedings of the 4 th Weurman flavor research symposium. Dourdan (France). In: Development in Food Science, Ed. J. Adda. Elsevier, Amsterdam.10: (1985) p. 261-266.

GRANDA F. VALENCIA S. MARÍN J. M. RESTREPO G. Optimización Del Método De Microextracción En Fase Sólida Acoplada A Cromatografía Gaseosa Para Análisis De Metanol En Agua. Revista Colombiana de Química, vol. 40, núm. 2, p.201-210. Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia.2011.

GUERRERO Y. Proceso de fermentación del cacao. Facultad de ingeniería agroindustrial. Universidad nacional de San Martín. Perú. p. 9.

HASHIM P., JINAP S., MUHAMMAD SKS, ALI A. Effect of drying time bean depth and temperature on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentrations of Malaysian cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 987-994. 1999.

HII C. et al. Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems Engineering* 102. (2009) p.153-161.

HOFFMAN A. "Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas GC/MS". [Citado agosto 2014] Disponible en internet: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21937/Capitulo5.pdf>. p.46.

HOFMANN T. et al. Studies on radical intermediates in the early stage of the non-enzymatic browning of carbohydrates and primary amino acids, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, p.379-390.

JEANJEANN. Influence du génotype, de la fermentation et de la torréfaction sur le développement de l'arôme. Rôle des précurseurs d'arôme. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II. Francia. (1995) p. 200.

JINAP S. et. al. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during in broasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science of FoodAgriculture* 77: p. 441-448. 1998.

KATO H., HAYASE F. An approach to estimate the chemical structure of melanoidins, in S. Horiuchi, N. Taniguchi, F. Hayese, T. Kurata, T. Osawa (eds), the Maillard Reaction in Food Chemistry and Medical Science: Update for the Postgenomic Era, Vol. 1245, Elsevier, Amsterdam, 2002.

La reacción de Maillard. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. Archivo pdf. [citado 9 de febrero 2017] disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf

LEON J; LOPEZ J. "Identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de las semillas de cacao (*Theobroma cacao* L) por GC/FID/MSD". San Juan de Pasto, 2005. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, departamento de Química.

LLAMAS O. El cacao. Revista de la asociación nacional de tiendas de autoservicio y departamentales, A.C. (ANTAD), 2007.

LOAYZA W. "Influencia de la frecuencia de remoción, durante la fermentación, en la calidad sensorial del cacao (*Theobroma Cacao*, L.) de Satipo". Lima Perú.

2014. Tesis de grado (Químico). Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad De Química E Ingeniería Química, E.A.P. De Ingeniería Química.

LÓPEZ VALENCIA J.P., "Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metil ésteres de ácidos". Director: Juan Pablo Arrubla. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología, Programa de tecnología química. Pereira. 2008

Mecanismo de reacción del pardeamiento enzimático, [Citado 9 febrero de 2017]. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211616/Modulo_exe/Exe%20del%20modulo/leccin_11_pardeamiento_enzimtico.html

MIRALLES-GARCIA J. Chemical Composition and Flavour- Development of Cocoa Products by Thermal and Enzymatic Technologies. Thesis Ph. D. University of Salford, A Greater Manchester University, School of Environment and Life Sciences. 2008.

MOTTRAM D., LESEINEUR A. The effect of pH on the formation of aroma volatiles in meat-like Maillard systems, in Flavor Science and Technology, Y. Bessière and A. F. Thomas (eds), Wiley, Chichester, 1990, 121-124

NAMIKI M., HAYASHI T. Development of novel free radicals during amino-carbonyl reaction of sugar with amino acids, J. Agric. Food Chem., 1975, 23, p.487-491

NAVIA A. PAZMIÑO N. "Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación". Tesis de grado para la obtención del título: Ingenieros De Alimentos. Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil – Ecuador. 2012.

NAZARUDDIN R, HASSAN O, SAID M, SAMSUDIN W, IDRIS NA. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. Journal of Food Processing and Preservation 30: 280-298. 2005.

NIST. Índice de retención de Kovats teórico. [Citado octubre 2016]. Base de datos en línea. Disponible en: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>

Normas para la producción, distribución y comercialización de material de propagación vegetativa de cacao. [Citado febrero 8 2017]. Disponible en: http://www.avancejuridico.com/actualidad/documentosoficiales/2002/44736/a_ica_00474_2002.html

OBERPARLEITER S., ZIEGLEDER G. Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung A* 204: 156-160. 1997.

OKAYAMA. Cocoa of Theobroma. [Citado agosto 2014]. Disponible en internet: URL: <http://www.okayama-u.ac.jp/doc/lab.html>. 2003.

ORTIZ L. et al. "Influencia de varios factores sobre características del grano del cacao fermentado y secado al sol". *AgronomíaTropical*.59(2), (2009) p.119-127.

PAWLISZYN J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practic. Wiley-VCH Inc.: New York, p. 248.1997

PAWLISZYN, J. Applications of Solid Phase Microextraction. Ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK, p, 655.1999.

PORTILLO E, et al. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola* 9 (2), (2009) p.458-468.

PRETORIUS IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729. 2000.

QUIJANO C¹, CEBALLOS L², PINO J³. Análisis de compuestos volátiles en dos especies de *Theobroma* mediante HS-SPME. ¹ Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Dpto. de Química, Bogotá, Colombia.²Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba. ³Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Habana, Cuba.

RIZZI G. The Strecker degradation and its contribution to food flavor, in *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*, R. Teranishi, E. L. Wick, I. Hornstein (eds), Kluwer/Plenum, New York, 199, 335-343

RODRIGUEZ J, ESCALONA HB, OROZCO I. et al.. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International* 44: 250-258. 2011.

RODRÍGUEZ J. "Estudio de los compuestos volátiles de *Theobroma cacao* L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado". México, D.F. junio de 2011. Tesis de doctorado. Instituto politécnico nacional. Escuela nacional de ciencias biológicas.

ROJAS-MONROY G. Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Tesis de Maestría, Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico, 2005.

SÁNCHEZ, C. V. A. "Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial". Ecuador, 2007. Tesis de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad Técnica Estatal de Quevedo Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Ingeniería Agrónoma.

SANZ C. ANSORENA D. BELLOJ. y CID C. Optimization Head Space Temperature and Time Sampling for Identification of Volatile Compounds in Ground Roasted Arabica Coffee. 49: p. 223. 2001

SCHNERMANN P., SCHIEBERLE P. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 867-872. 1997.

SCHWAN RF., WHEALS AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44: 205-221. 2004.

SEGUINE E. "Cacao flavor through genetics- anatomy of fine flavor". [Citado octubre 2016]. Disponible en: http://www.finechocolateindustry.org/Resources/Documents/mc_HCP_2014_12_1.pdf

SERRA-BONVEHÍ J. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. European Food Research and Technology 221: p.19-29.2005.

STASHENKO, E. Acoplamiento GC-MS: sistemas de datos (Software). [Citado agosto 2014] Universidad Industrial de Santander. Laboratorio de Cromatografía. Escuela de Química. Disponible en Internet: <http://cromatografia.uis.edu.co/cursos>

SUKHA D. Desarrollo de Aromas del Cacao, UWI, Trinidad & Tobago, 2008.

THOMPSON S. MILLER K. LOPEZ A. "Cocoa and coffee". Food microbiology, fundamentals and frontiers, second edition. Washington DC, (2001): American Society for Microbiology. p.721- 733.

WACHER M. Microorganismos y chocolate. Revista Digital Universitaria Volumen 12 Número 4 ISSN: 1067-6079. 1 de abril 2011. p. 4-5

WEENEN H., APELDOORN W. Carbohydrate cleavage in the Maillard reaction. In Flavour Science: Recent Developments, Vol. 197, A. J. Taylor and D. S. Mottram (eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996, 211-216

WILEY. Espectros de masas. Base de datos equipo (cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas SHIMATZU CUPER-2010s

XIAO Z. et al. Accelerated green process of tetramethylpyrazine production from glucose and diammonium phosphate. Biotechnology for biofuels. (2014) p. 2.

ANEXOS

ANEXO A. Datos experimentales de la metodología de superficie de respuesta.

| Corridas de Análisis | COVs Total | 500 COVs | 1000 COVs | 100 COVs | Deseabilidad | |
|-------------------------|---------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-----------|
| | | | | | Prevista | Observada |
| 1 | 215669, | 41,0 | 29,0 | 77,0 | 0,365621 | 0,352718 |
| 2 | 229394, | 35,0 | 21,0 | 70,0 | 0,389888 | 0,278229 |
| 3 | 84313,0 | 22,0 | 15,0 | 50,0 | 0,125934 | 0,0808823 |
| 4 | 99275,0 | 23,0 | 15,0 | 64,0 | 0,195739 | 0,112109 |
| 5 | 90180,0 | 27,0 | 20,0 | 69,0 | 0,220531 | 0,148138 |
| 6 | 304740, | 46,0 | 34,0 | 88,0 | 0,423695 | 0,465817 |
| 7 | 216627, | 41,0 | 25,0 | 93,0 | 0,3809 | 0,358508 |
| 8 | 263861, | 30,0 | 21,0 | 51,0 | 0,180406 | 0,225715 |
| 9 | 667236, | 99,0 | 62,0 | 109,0 | 0,707504 | 1,0 |
| 10 | 334709, | 37,0 | 25,0 | 59,0 | 0,293239 | 0,32135 |
| 11 | 82337,0 | 27,0 | 18,0 | 54,0 | 0,124661 | 0,111245 |
| 12 | 216179, | 59,0 | 42,0 | 105,0 | 0,482015 | 0,523801 |
| 13 | 68822,0 | 26,0 | 20,0 | 51,0 | 0,167682 | 0,079836 |
| 14 | 287732, | 26,0 | 20,0 | 56,0 | 0,246259 | 0,22103 |
| 15 | 78629,0 | 20,0 | 16,0 | 36,0 | 0,0593009 | 0,0461508 |
| 16 | 90180,0 | 23,0 | 17,0 | 52,0 | 0,112911 | 0,101902 |
| 17 | 169057, | 35,0 | 20,0 | 73,0 | 0,254418 | 0,246701 |
| 18 | 203938, | 26,0 | 11,0 | 43,0 | 0,225932 | 0,0 |
| 19 | 107709, | 22,0 | 18,0 | 53,0 | 0,179773 | 0,117308 |
| 20 | 79018,0 | 17,0 | 13,0 | 37,0 | 0,0712469 | 0,0280708 |
| 21 | 312666, | 46,0 | 31,0 | 100,0 | 0,354665 | 0,476414 |
| 22 | 570189, | 71,0 | 53,0 | 102,0 | 0,649976 | 0,802986 |
| 23 | 362578, | 35,0 | 28,0 | 66,0 | 0,390672 | 0,357861 |
| 24 | 110745, | 31,0 | 22,0 | 71,0 | 0,218876 | 0,197179 |
| 25 | 267712, | 46,0 | 31,0 | 82,0 | 0,431418 | 0,41915 |
| 26 | 203938, | 21,0 | 15,0 | 43,0 | 0,132409 | 0,109593 |
| 27 | 247932, | 35,0 | 23,0 | 58,0 | 0,320391 | 0,271122 |
| 28 | 202149, | 41,0 | 27,0 | 67,0 | 0,309733 | 0,313698 |
| 29 | 246586, | 47,0 | 35,0 | 77,0 | 0,333356 | 0,418943 |
| 30 | 96972,0 | 22,0 | 18,0 | 48,0 | 0,065902 | 0,101748 |
| 31 | 132369, | 24,0 | 17,0 | 65,0 | 0,133884 | 0,152542 |
| 32 | 137622, | 32,0 | 24,0 | 67,0 | 0,153711 | 0,227619 |
| 33 | 214054, | 41,0 | 28,0 | 95,0 | 0,365724 | 0,377828 |
| 34 | 145772, | 36,0 | 22,0 | 54,0 | 0,324214 | 0,210076 |
| 35 | 190289, | 23,0 | 17,0 | 41,0 | 0,124202 | 0,12161 |
| 36 | 270533, | 42,0 | 29,0 | 84,0 | 0,653152 | 0,399236 |
| 37 | 348093, | 34,0 | 24,0 | 63,0 | 0,238192 | 0,318399 |
| 38 | 76326,0 | 26,0 | 18,0 | 51,0 | 0,0 | 0,094667 |
| 39 | 267332, | 42,0 | 27,0 | 85,0 | 0,423809 | 0,38802 |
| 40 | 89713,0 | 30,0 | 24,0 | 60,0 | 0,0 | 0,159805 |
| 41 | 289832, | 26,0 | 20,0 | 56,0 | 0,189861 | 0,221547 |
| 42 | 63955,0 | 22,0 | 14,0 | 33,0 | 0,0 | 0,0 |
| 43 | 99463,0 | 26,0 | 18,0 | 55,0 | 0,0 | 0,129559 |
| 44 | 170337, | 28,0 | 18,0 | 58,0 | 0,195771 | 0,184194 |
| 45 | 203515, | 35,0 | 24,0 | 72,0 | 0,170092 | 0,288493 |

| | | | | | | |
|----|---------|------|------|------|-----------|----------|
| 46 | 91455,0 | 26,0 | 18,0 | 60,0 | 0,119546 | 0,127924 |
| 47 | 71662,0 | 16,0 | 11,0 | 36,0 | 0,0 | 0,0 |
| 48 | 163406, | 31,0 | 24,0 | 75,0 | 0,297049 | 0,254524 |
| 49 | 227890, | 41,0 | 27,0 | 95,0 | 0,594469 | 0,380439 |
| 50 | 277482, | 34,0 | 26,0 | 67,0 | 0,335445 | 0,317014 |
| 51 | 117114, | 32,0 | 24,0 | 72,0 | 0,12308 | 0,21711 |
| 52 | 220895, | 39,0 | 26,0 | 75,0 | 0,376352 | 0,329007 |
| 53 | 278293, | 21,0 | 15,0 | 41,0 | 0,0672534 | 0,115295 |
| 54 | 238116, | 33,0 | 22,0 | 58,0 | 0,266101 | 0,2545 |

ANEXO B. Resultados cromatográficos para el cacao CCN51 en las condiciones óptimas por GC.

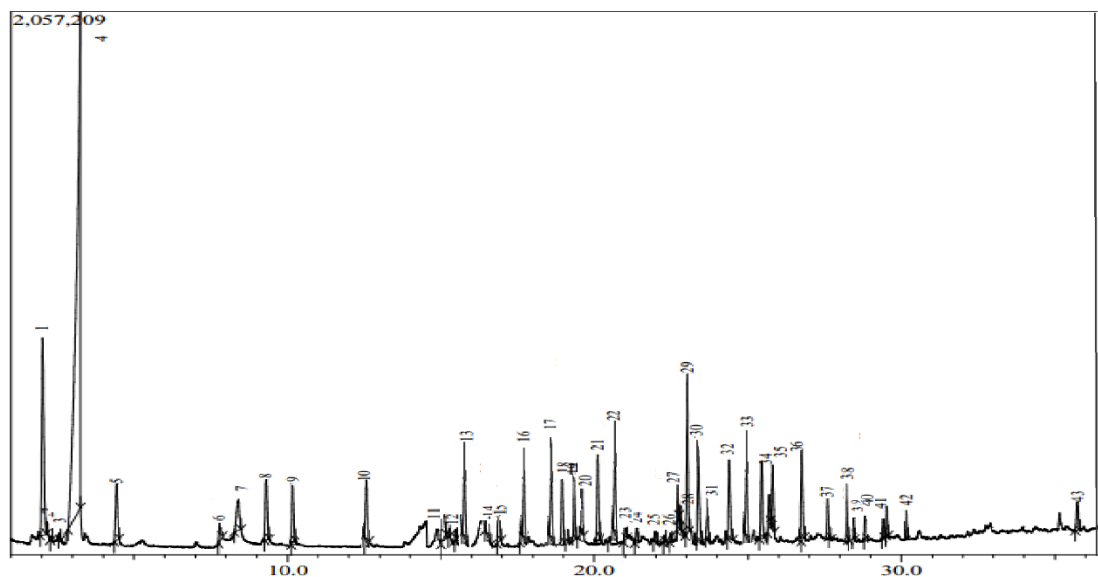
FID Results

| Retention Time | Area | Area % | Height | Height % |
|----------------|-------|--------|--------|----------|
| 1.583 | 73 | 0.03 | 57 | 0.08 |
| 1.740 | 154 | 0.06 | 135 | 0.19 |
| 1.870 | 136 | 0.05 | 77 | 0.11 |
| 1.938 | 552 | 0.20 | 298 | 0.43 |
| 2.063 | 133 | 0.05 | 74 | 0.11 |
| 2.203 | 660 | 0.24 | 557 | 0.80 |
| 2.397 | 212 | 0.08 | 170 | 0.24 |
| 2.457 | 322 | 0.12 | 265 | 0.38 |
| 2.753 | 124 | 0.05 | 201 | 0.29 |
| 2.940 | 36228 | 13.39 | 7034 | 10.11 |
| 3.123 | 2511 | 0.93 | 1505 | 2.16 |
| 3.261 | 545 | 0.20 | 371 | 0.53 |
| 4.056 | 3810 | 1.41 | 1555 | 2.23 |
| 4.810 | 776 | 0.29 | 310 | 0.45 |
| 6.820 | 40510 | 14.97 | 4484 | 6.44 |
| 7.310 | 26139 | 9.66 | 3561 | 5.12 |
| 7.770 | 289 | 0.11 | 84 | 0.12 |
| 10.981 | 3252 | 1.20 | 665 | 0.96 |
| 12.533 | 1054 | 0.39 | 330 | 0.47 |
| 14.027 | 1398 | 0.52 | 399 | 0.57 |
| 14.234 | 189 | 0.07 | 102 | 0.15 |
| 14.292 | 1667 | 0.62 | 592 | 0.85 |
| 14.496 | 5987 | 2.21 | 1681 | 2.41 |
| 14.749 | 796 | 0.29 | 290 | 0.42 |
| 15.446 | 8089 | 2.99 | 2073 | 2.98 |
| 15.822 | 8580 | 3.17 | 2290 | 3.29 |
| 16.667 | 218 | 0.08 | 88 | 0.13 |
| 16.959 | 8713 | 3.22 | 2246 | 3.23 |
| 18.164 | 154 | 0.06 | 54 | 0.08 |
| 18.442 | 242 | 0.09 | 88 | 0.13 |
| 18.792 | 1165 | 0.43 | 381 | 0.55 |
| 18.959 | 14164 | 5.24 | 3706 | 5.32 |
| 19.605 | 398 | 0.15 | 145 | 0.21 |
| 19.680 | 170 | 0.06 | 92 | 0.13 |
| 19.990 | 758 | 0.28 | 269 | 0.39 |
| 20.504 | 673 | 0.25 | 213 | 0.31 |
| 20.659 | 116 | 0.04 | 49 | 0.07 |
| 20.769 | 722 | 0.27 | 213 | 0.31 |
| 20.875 | 1189 | 0.44 | 452 | 0.65 |
| 21.409 | 307 | 0.11 | 157 | 0.23 |
| 21.620 | 834 | 0.31 | 239 | 0.34 |
| 21.754 | 1408 | 0.52 | 434 | 0.62 |
| 21.815 | 688 | 0.25 | 352 | 0.51 |
| 21.920 | 372 | 0.14 | 160 | 0.23 |
| 22.104 | 253 | 0.09 | 123 | 0.18 |

| | | | | |
|--------|-------|------|------|------|
| 22.184 | 5174 | 1.91 | 1938 | 2.78 |
| 22.500 | 21796 | 8.06 | 6524 | 9.37 |
| 22.780 | 661 | 0.24 | 312 | 0.45 |
| 23.230 | 2767 | 1.02 | 1118 | 1.61 |
| 23.304 | 173 | 0.06 | 112 | 0.16 |
| 23.573 | 21587 | 7.98 | 6264 | 9.00 |
| 23.798 | 222 | 0.08 | 110 | 0.16 |
| 24.478 | 290 | 0.11 | 130 | 0.19 |
| 24.625 | 5533 | 2.05 | 1462 | 2.10 |
| 24.867 | 178 | 0.07 | 95 | 0.14 |
| 24.977 | 174 | 0.06 | 106 | 0.15 |
| 25.035 | 2487 | 0.92 | 1089 | 1.56 |
| 25.123 | 94 | 0.03 | 51 | 0.07 |
| 25.267 | 119 | 0.04 | 58 | 0.08 |
| 25.543 | 242 | 0.09 | 116 | 0.17 |
| 25.727 | 281 | 0.10 | 98 | 0.14 |
| 26.187 | 259 | 0.10 | 88 | 0.13 |
| 26.465 | 2085 | 0.77 | 725 | 1.04 |
| 27.258 | 1229 | 0.45 | 344 | 0.49 |
| 28.062 | 2996 | 1.11 | 1065 | 1.53 |
| 28.317 | 295 | 0.11 | 108 | 0.16 |
| 28.458 | 9907 | 3.66 | 3710 | 5.33 |
| 28.916 | 4876 | 1.80 | 1664 | 2.39 |
| 29.853 | 214 | 0.08 | 96 | 0.14 |
| 30.215 | 402 | 0.15 | 154 | 0.22 |
| 30.628 | 302 | 0.11 | 127 | 0.18 |
| 30.706 | 105 | 0.04 | 52 | 0.07 |
| 31.735 | 489 | 0.18 | 219 | 0.31 |
| 32.513 | 654 | 0.24 | 254 | 0.36 |
| 32.705 | 301 | 0.11 | 116 | 0.17 |
| 34.208 | 125 | 0.05 | 45 | 0.06 |
| 34.401 | 163 | 0.06 | 69 | 0.10 |
| 35.264 | 4894 | 1.81 | 1502 | 2.16 |
| 35.709 | 497 | 0.18 | 149 | 0.21 |
| 38.056 | 559 | 0.21 | 178 | 0.26 |
| 38.184 | 342 | 0.13 | 152 | 0.22 |
| 38.369 | 167 | 0.06 | 71 | 0.10 |
| 42.877 | 428 | 0.16 | 159 | 0.23 |
| 44.400 | 410 | 0.15 | 191 | 0.27 |
| 44.834 | 191 | 0.07 | 112 | 0.16 |
| 46.770 | 135 | 0.05 | 55 | 0.08 |

| | | | | |
|--------|--------|--------|-------|--------|
| Totals | 270533 | 100.00 | 69609 | 100.00 |
|--------|--------|--------|-------|--------|

ANEXO C. Cromatograma y tablas de datos del cacao CCN51 por GC-MS



Replica 1

| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area | Area% | Name |
|-------|--------|--------|--------|----------|-------|--|
| 1 | 2.026 | 1.945 | 2.150 | 2895213 | 8.84 | 2-Propanol (CAS) |
| 2 | 2.304 | 2.285 | 2.345 | 34469 | 0.11 | PROPANAL, 2-METHYL- \$\$ 2-METHYLPROPANAL \$\$ |
| 3 | 2.581 | 2.555 | 2.625 | 48583 | 0.15 | Butanol, 2-ethyl- (CAS) \$\$ 2-Ethylbutanol |
| 4 | 3.258 | 2.860 | 3.265 | 12861048 | 39.26 | Acetic acid (CAS) \$\$ Ethylic acid \$\$ Vinegar acid |
| 5 | 4.433 | 4.355 | 4.530 | 522404 | 1.59 | Butanal, 3-methyl- (CAS) |
| 6 | 7.823 | 7.750 | 7.895 | 66522 | 0.20 | Butanal, 2-methyl- (CAS) |
| 7 | 8.410 | 8.270 | 8.490 | 542650 | 1.66 | 3-hydroxy-2-butanone |
| 8 | 9.289 | 9.245 | 9.405 | 714211 | 2.18 | 2,3-Butanediol |
| 9 | 10.166 | 10.120 | 10.210 | 518382 | 1.58 | 1,3-Butanediol |
| 10 | 12.574 | 12.505 | 12.650 | 589656 | 1.80 | Methylpyrazina |
| 11 | 15.037 | 14.995 | 15.165 | 151452 | 0.46 | 2-Furanmethanol |
| 12 | 15.261 | 15.230 | 15.300 | 133903 | 0.41 | 2-heptanol |
| 13 | 15.476 | 15.440 | 15.520 | 802743 | 2.45 | Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) |
| 14 | 16.515 | 16.440 | 16.640 | 75642 | 0.23 | Butyrolactone |
| 15 | 16.889 | 16.820 | 16.965 | 99021 | 0.30 | Pyrazine, 2,3-dimethyl- |
| 16 | 17.624 | 17.570 | 17.685 | 739479 | 2.26 | Ethyl butanoate |
| 17 | 19.116 | 19.060 | 19.165 | 796559 | 2.43 | Acetic acid, ethyl ester (CAS) |
| 18 | 19.356 | 19.300 | 19.410 | 355156 | 1.08 | Benzaldehyde |
| 19 | 19.490 | 19.460 | 19.520 | 375609 | 1.15 | 5-methyl furfural |
| 20 | 19.579 | 19.530 | 19.660 | 274085 | 0.84 | Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl- |
| 21 | 20.515 | 20.450 | 20.580 | 533570 | 1.63 | Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl |
| 22 | 21.001 | 20.950 | 21.070 | 875252 | 2.67 | Pyrazine, trimethyl- |
| 23 | 21.384 | 21.315 | 21.445 | 95156 | 0.29 | Sec-butyl acetate |
| 24 | 21.994 | 21.930 | 22.050 | 121357 | 0.37 | Benzeneacetaldehyde |
| 25 | 22.301 | 22.245 | 22.335 | 78128 | 0.24 | Beta ocimene |
| 26 | 22.494 | 22.450 | 22.550 | 302756 | 0.92 | MESO-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 27 | 22.723 | 22.680 | 22.755 | 677322 | 2.07 | Acetophenone |
| 28 | 22.815 | 22.780 | 22.860 | 112855 | 0.34 | D,L-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 29 | 23.038 | 22.965 | 23.125 | 1480711 | 4.52 | Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (CAS) |
| 30 | 23.369 | 23.330 | 23.420 | 788574 | 2.41 | Pyrazine, tetramethyl- (CAS) |
| 31 | 23.694 | 23.615 | 23.775 | 305131 | 0.93 | 2-nonanone |
| 32 | 24.392 | 24.325 | 24.505 | 583033 | 1.78 | 2-Isopropyl-5-methylhex-2-enal |
| 33 | 25.451 | 25.380 | 25.520 | 718312 | 2.19 | Benzeneethanol (CAS) |
| 34 | 25.696 | 25.645 | 25.750 | 605375 | 1.85 | trans Isomenthone |
| 35 | 25.812 | 25.770 | 25.865 | 370730 | 1.13 | 2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazina |
| 36 | 26.786 | 26.740 | 26.825 | 672260 | 2.05 | cis Isomenthone |
| 37 | 27.665 | 27.640 | 27.710 | 307086 | 0.94 | Ethyl caprylate \$\$ Ethyl octanoate |
| 38 | 28.327 | 28.275 | 28.385 | 556278 | 1.70 | Benzeneacetic acid, ethyl ester (CAS) \$\$ Ethyl phenylacetate |
| 39 | 28.448 | 28.400 | 28.490 | 168035 | 0.51 | 2-Butenal-2-phenyl |

| | | | | | | |
|----|--------|--------|--------|----------|--------|------------------------------------|
| 40 | 28.842 | 28.785 | 28.900 | 133711 | 0.41 | Acetic acid, 2-phenylethyl ester |
| 41 | 29.414 | 29.365 | 29.460 | 157475 | 0.48 | 2-Indano[2,1-d]1,3-dioxane |
| 42 | 29.522 | 29.485 | 29.575 | 220911 | 0.67 | Pyrazine, 3-isopentyl-2,5-dimethyl |
| 43 | 35.730 | 35.655 | 35.815 | 299139 | 0.91 | 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal |
| | | | | 32759944 | 100.00 | |

Replica 2

| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area | Area% | Name |
|-------|--------|--------|--------|----------|-------|---|
| 1 | 2.030 | 1.970 | 2.140 | 2598714 | 7.92 | 2-Propanol |
| 2 | 3.208 | 2.730 | 3.215 | 14552698 | 44.36 | Acetic acid |
| 3 | 3.273 | 3.230 | 3.330 | 470998 | 1.44 | Butanal, 3-methyl- (CAS) \$\$ 3-Methylbutanal \$\$ Isovaleraldehyde |
| 4 | 4.448 | 4.355 | 4.560 | 63995 | 0.20 | Butanal, 2-methyl- (CAS) |
| 5 | 5.274 | 5.240 | 5.340 | 590712 | 1.80 | 3-hydroxy-2-butanone |
| 6 | 7.015 | 6.975 | 7.085 | 695123 | 2.12 | 2,3-Butanediol |
| 7 | 7.776 | 7.640 | 7.880 | 514058 | 1.57 | 1,3-Butanediol (CAS) \$\$ 1,3-Butylene glycol \$\$ 1,3-Dihydroxybutane |
| 8 | 8.366 | 8.235 | 8.445 | 610149 | 1.86 | Pyrazine, methyl- (CAS) |
| 9 | 9.279 | 9.235 | 9.370 | 153288 | 0.51 | 2-Furanmethanol (CAS) |
| 10 | 12.563 | 12.485 | 12.685 | 142546 | 0.43 | 2-heptanol |
| 11 | 15.003 | 14.965 | 15.110 | 820568 | 2.50 | Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,5-Dimethylpyrazine \$\$ PYRAZINE, 2,5-DIMETHYL |
| 12 | 15.265 | 15.230 | 15.320 | 81554 | 0.25 | 2(3H)-Furanone, dihydro- (CAS) \$\$ Butyrolactone |
| 13 | 15.445 | 15.405 | 15.475 | 95462 | 0.29 | Pyrazine, 2,3-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,3-Dimethylpyrazine \$\$ 2,3-dimethyl pyrazine |
| 14 | 16.507 | 16.445 | 16.565 | 818444 | 2.49 | Ethyl butanoate |
| 15 | 16.866 | 16.820 | 16.915 | 715312 | 2.18 | Acetic acid, ethyl ester (CAS) |
| 16 | 17.631 | 17.590 | 17.705 | 348251 | 1.06 | Benzaldehyde (CAS) \$\$ Phenylmethanal \$\$ Benzenecarbal |
| 17 | 17.858 | 17.815 | 17.890 | 341372 | 1.04 | 5-methyl furfural |
| 18 | 19.137 | 19.095 | 19.180 | 278952 | 0.85 | Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl- (CAS) \$\$ 2-Ethyl-6-methylpyrazine |
| 19 | 19.349 | 19.305 | 19.410 | 515879 | 1.57 | Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methyl-5-ethylpyrazine \$\$ 2-Ethyl-5-methylpy |
| 20 | 19.475 | 19.435 | 19.490 | 813655 | 2.48 | Pyrazine, trimethyl- (CAS) \$\$ Trimethylpyrazine \$\$ 2,3,5-Trimethylpyrazine |
| 21 | 19.547 | 19.500 | 19.605 | 82972 | 0.25 | Sec-butyl acetate |
| 22 | 21.380 | 21.340 | 21.425 | 116231 | 0.35 | Benzeneacetaldehyde (CAS) \$\$ Hyacinthin \$\$ Phenylethanal \$\$ Phenylacetaldehyde |
| 23 | 21.751 | 21.730 | 21.785 | 66027 | 0.20 | Beta ocimene |
| 24 | 21.989 | 21.920 | 22.035 | 325471 | 0.99 | MESO-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 25 | 22.303 | 22.265 | 22.335 | 654487 | 1.99 | Acetophenone \$\$ Phenyl methyl ketone |
| 26 | 22.706 | 22.655 | 22.805 | 125468 | 0.38 | D,L-2,3-BUTANDIOL DIACETATE \$\$ 2,3-Butanedioldiacetate |
| 27 | 23.013 | 22.955 | 23.075 | 1299875 | 3.96 | Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (CAS) |
| 28 | 23.693 | 23.660 | 23.725 | 265891 | 0.81 | 2-nonanone |
| 29 | 24.368 | 24.310 | 24.455 | 628947 | 1.92 | 2-Isopropyl-5-methylhex-2-enal |
| 30 | 25.457 | 25.415 | 25.495 | 658921 | 2.01 | Benzeneethanol (CAS) |
| 31 | 25.678 | 25.625 | 25.725 | 513798 | 1.57 | trans Isomenthone |
| 32 | 25.814 | 25.775 | 25.855 | 408146 | 1.24 | 2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine \$\$ 2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine |
| 33 | 26.791 | 26.755 | 26.825 | 613907 | 1.87 | cis- Isomenthone |
| 34 | 28.332 | 28.280 | 28.385 | 275677 | 0.84 | Ethyl caprylate \$\$ Ethyl octanoate |
| 35 | 28.450 | 28.410 | 28.495 | 58186 | 0.18 | 2-Octanol, acetate (CAS) |
| 36 | 28.849 | 28.790 | 28.905 | 580312 | 1.77 | Benzeneacetic acid, ethyl ester \$\$ Acetic acid, phenyl-, ethyl ester |
| 37 | 29.422 | 29.360 | 29.470 | 161781 | 0.49 | 2-Butenal-2-phenyl |
| 38 | 30.213 | 30.165 | 30.245 | 72884 | 0.22 | Indano[2,1-d]1,3-dioxane |
| 39 | 30.556 | 30.515 | 30.620 | 225879 | 0.69 | Pyrazine, 3-isopentyl-2,5-dimethyl |
| 40 | 34.671 | 34.635 | 34.720 | 67247 | 0.20 | Isopentyl alcohol, benzoate |
| 41 | 35.731 | 35.670 | 35.810 | 271935 | 0.83 | 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal |
| 42 | 38.334 | 38.310 | 38.360 | 18351 | 0.06 | Hexadecanoic acid, ethyl ester \$\$ Palmitic acid, ethyl ester |
| 43 | 44.552 | 44.525 | 44.585 | 92723 | 0.28 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl octyl ester |
| | | | | 32820990 | 100 | |

Replica 3

| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area | Area% | Name |
|-------|--------|--------|--------|----------|-------|--|
| 1 | 2.034 | 1.975 | 2.115 | 2491185 | 7.42 | 2-Propanol (CAS) \$\$ Isopropyl alcohol (CAS) \$\$ PRO \$\$ Propan-2-ol \$\$ Isohol \$\$ Pro |
| 2 | 3.178 | 2.870 | 3.190 | 13701998 | 40.81 | Acetic acid (CAS) \$\$ Ethylic acid \$\$ Vinegar acid \$\$ Ethanoic acid \$\$ Glacial acetic aci |
| 3 | 3.274 | 3.225 | 3.335 | 450312 | 1.34 | Butanal, 3-methyl- (CAS) \$\$ 3-Methylbutanal \$\$ Isovaleraldehyde (CAS) \$\$ Isovaleral |
| 4 | 3.418 | 3.375 | 3.500 | 62713 | 0.19 | Butanal, 2-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methylbutanal \$\$ ISOVALERALDEHYDE (2-METHYL |
| 5 | 4.445 | 4.360 | 4.550 | 559895 | 1.67 | 3-hydroxy-2-butanone |
| 6 | 7.746 | 7.625 | 7.835 | 719112 | 2.14 | 2,3-BUTANEDIOL \$\$ BUTANE-2,3-DIOL \$\$ 2,3-BUTANDIOL \$\$ 2,3-BUTYLENE G |
| 7 | 8.321 | 8.300 | 8.390 | 510154 | 1.52 | 1,3-Butanediol \$\$ Butane-2,3-diol \$\$ Dimethylethylene glycol \$\$ 2,3-Butylene glycol \$\$ |
| 8 | 9.261 | 9.215 | 9.305 | 650895 | 1.94 | Pyrazine, methyl- (CAS) \$\$ Methylpyrazine \$\$ METHYL-1,4-DIAZINE \$\$ 2-Methylpy |
| 9 | 12.546 | 12.485 | 12.645 | 145689 | 0.43 | 2-Furanmethanol (CAS) |
| 10 | 14.327 | 14.275 | 14.370 | 62027 | 0.18 | Decane \$\$ n-Decane \$\$ n-C10H22 \$\$ UN 2247 \$\$ |
| 11 | 14.831 | 14.775 | 14.850 | 139537 | 0.42 | 2-HEPTANOL \$\$ HEPTAN-2-OL \$\$ 1-METHYLHEXANOL \$\$ 2-HEPTANOL (NATU |
| 12 | 14.990 | 14.940 | 15.155 | 816712 | 2.43 | Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,5-Dimethylpyrazine \$\$ PYRAZINE, 2,5-DIMETHY |
| 13 | 15.266 | 15.225 | 15.325 | 82255 | 0.25 | gamma Butyrolactone |
| 14 | 15.429 | 15.390 | 15.485 | 100213 | 0.30 | Pyrazine, 2,3-dimethyl- \$\$ 2,3-Dimethylpyrazine \$\$ 2,3-Dimethyl pyrazine |
| 15 | 16.501 | 16.425 | 16.560 | 742399 | 2.21 | Ethyl Butanoate |

| | | | | | |
|----|--------------|--------|----------|--------|--|
| 16 | 16.86516.800 | 16.960 | 854622 | 2,55 | Acetic acid, ethyl ester (CAS) |
| 17 | 17.63217.570 | 17.750 | 395421 | 1,18 | Benzaldehyde (CAS) |
| 18 | 17.84617.810 | 17.885 | 299572 | 0,89 | 5-methyl furfural \$\$ 2-FURANCARBOXALDEHYDE, 5-METHYL- \$\$ 5-METHYLF |
| 19 | 19.13719.070 | 19.190 | 192074 | 0,57 | BENZENE, 1,2,4-TRIMETHYL- |
| 20 | 19.36019.290 | 19.405 | 231337 | 0,69 | Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl. |
| 21 | 19.46219.430 | 19.480 | 588716 | 1,75 | Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methyl-5-ethylpyrazine \$\$ 2-Ethyl-5-methylpyra |
| 22 | 19.54119.495 | 19.615 | 951246 | 2,83 | Pyrazine, trimethyl- (CAS) \$\$ Trimethylpyrazine \$\$ 2,3,5-Trimethylpyrazine \$\$ 2,3,6-Tr |
| 23 | 20.97120.860 | 21.075 | 256086 | 0,76 | Pyrazine, 2-ethenyl-5-methyl- (CAS) \$\$ METHYL-2-VINYL-5-PYRAZINE \$\$ 2-Methy |
| 24 | 21.20121.145 | 21.280 | 86118 | 0,24 | Sec-butyl acetate |
| 25 | 21.38421.335 | 21.430 | 148551 | 0,44 | Benzeneacetaldehyde (CAS) \$\$ Hyacinthin \$\$ Phenylethanal \$\$ Phenylacetaldehyde \$\$. |
| 26 | 21.57421.535 | 21.615 | 81256 | 0,24 | Beta ocimene |
| 27 | 21.99521.935 | 22.040 | 378492 | 1,13 | MESO-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 28 | 22.30322.255 | 22.350 | 691313 | 2,06 | Acetophenone \$\$ Phenyl methyl ketone |
| 29 | 22.50022.435 | 22.550 | 110211 | 0,33 | D,L-2,3-BUTANDIOL DIACETATE \$\$ 2,3-Butanedioldiacetate \$\$ 2,3-BUTANEDIOL, |
| 30 | 22.70422.640 | 22.790 | 1352781 | 4,03 | Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (CAS) |
| 31 | 23.01122.955 | 23.065 | 711549 | 2,12 | Pyrazine, tetramethyl- (CAS) |
| 32 | 23.38523.335 | 23.415 | 312598 | 0,93 | 2-nonanone |
| 33 | 23.69523.660 | 23.735 | 589346 | 1,76 | 2-Isopropyl-5-methylhex-2-enal \$\$ 2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal \$\$ 2-Hexenal, 5-met |
| 34 | 24.36824.310 | 24.470 | 625897 | 1,86 | Benzeneethanol (CAS) \$\$ Phenethyl alcohol (CAS) \$\$ PEA \$\$ PHENETHYL ALCOLH |
| 35 | 25.46325.405 | 25.510 | 599671 | 1,79 | trans Isomenthone |
| 36 | 25.67425.620 | 25.725 | 450713 | 1,34 | 2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine \$\$ 2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine |
| 37 | 25.81625.760 | 25.875 | 699872 | 2,08 | cis- Isomenthone |
| 38 | 26.79126.755 | 26.825 | 305189 | 0,91 | Ethyl caprylate \$\$ Ethyl octanoate |
| 39 | 27.67127.640 | 27.710 | 81621 | 0,24 | Butanoic acid, 2-methyl-3-oxo-, methyl ester \$\$ Acetoacetic acid, 2-methyl-, methyl ester |
| 40 | 28.33428.280 | 28.380 | 125487 | 0,37 | acetic acid, 2-phenylethyl ester \$\$ phenethyl alcohol, acetate |
| 41 | 28.45028.415 | 28.480 | 413828 | 1,23 | Benzeneacetic acid, ethyl ester \$\$ Acetic acid, phenyl-, ethyl ester \$\$.alpha.-Toluic acid, |
| 42 | 28.84728.790 | 28.895 | 142609 | 0,42 | 2-Butenal-2-phenyl |
| 43 | 29.42029.375 | 29.475 | 208416 | 0,62 | 2-Indano[2,1-d]1,3-dioxane |
| 44 | 30.57730.530 | 30.620 | 199875 | 0,60 | Pyrazine, 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)- \$ Pyrazine, 3-isopentyl-2,5-dimethyl |
| 45 | 35.73535.675 | 35.780 | 253431 | 0,75 | 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal |
| | | | 33332626 | 100,00 | |

ANEXO D. Resultados de muestras de cacao CCN51 de diferentes días.

Día 1.

| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area | Area% Name |
|-------|--------|--------|--------|----------|--|
| 1 | 2.034 | 1.975 | 2.115 | 2491185 | 7,42 2-Propanol (CAS) \$\$ Isopropyl alcohol (CAS) \$\$ PRO \$\$ Propan-2-ol \$\$ Isohol \$\$ Pro |
| 2 | 3.178 | 2.870 | 3.190 | 13701998 | 40,81 Acetic acid (CAS) \$\$ Ethylic acid \$\$ Vinegar acid \$\$ Ethanoic acid \$\$ Glacial acetic aci |
| 3 | 3.274 | 3.225 | 3.335 | 450312 | 1,34 Butanal, 3-methyl- (CAS) \$\$ 3-Methylbutanal \$\$ Isovaleraldehyde (CAS) \$\$ Isovaleral |
| 4 | 3.418 | 3.375 | 3.500 | 62713 | 0,19 Butanal, 2-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methylbutanal \$\$ ISOVALERALDEHYDE (2-METHYL |
| 5 | 4.445 | 4.360 | 4.550 | 559895 | 1,67 3-hydroxy-2-butanone |
| 6 | 7.746 | 7.625 | 7.835 | 719112 | 2,14 2,3-BUTANEDIOL \$\$ BUTANE-2,3-DIOL \$\$ 2,3-BUTANDIOL \$\$ 2,3-BUTYLENE G |
| 7 | 8.321 | 8.300 | 8.390 | 510154 | 1,52 1,3-Butanediol \$\$ Butane-2,3-diol \$\$ Dimethylethylene glycol \$\$ 2,3-Butylene glycol \$\$ |
| 8 | 9.261 | 9.215 | 9.305 | 650895 | 1,94 Pyrazine, methyl- (CAS) \$\$ Methylpyrazine \$\$ METHYL-1,4-DIAZINE \$\$ 2-Methylpy |
| 9 | 12.546 | 12.485 | 12.645 | 145689 | 0,43 2-Furanmethanol (CAS) |
| 10 | 14.327 | 14.275 | 14.370 | 62027 | 0,18 Decane \$\$ n-Decane \$\$ n-C10H22 \$\$ UN 2247 \$\$ |
| 11 | 14.831 | 14.775 | 14.850 | 139537 | 0,42 2-HEPTANOL \$\$ HEPTAN-2-OL \$\$ 1-METHYLHEXANOL \$\$ 2-HEPTANOL (NATU |
| 12 | 14.990 | 14.940 | 15.155 | 816712 | 2,43 Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,5-Dimethylpyrazine \$\$ PYRAZINE, 2,5-DIMETHY |
| 13 | 15.266 | 15.225 | 15.325 | 82255 | 0,25 gamma Butyrolactone |
| 14 | 15.429 | 15.390 | 15.485 | 100213 | 0,30 Pyrazine, 2,3-dimethyl- \$\$ 2,3-Dimethylpyrazine \$\$ 2,3-Dimethyl pyrazine |
| 15 | 16.501 | 16.425 | 16.560 | 742399 | 2,21 Ethyl Butanoate |
| 16 | 16.865 | 16.800 | 16.960 | 854622 | 2,55 Acetic acid, ethyl ester (CAS) |
| 17 | 17.632 | 17.570 | 17.750 | 395421 | 1,18 Benzaldehyde (CAS) |
| 18 | 17.846 | 17.810 | 17.885 | 299572 | 0,89 5-methyl furfural \$\$ 2-FURANCARBOXALDEHYDE, 5-METHYL- \$\$ 5-METHYLF |
| 19 | 19.137 | 19.070 | 19.190 | 192074 | 0,57 BENZENE, 1,2,4-TRIMETHYL- |
| 20 | 19.360 | 19.290 | 19.405 | 231337 | 0,69 Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl. |
| 21 | 19.462 | 19.430 | 19.480 | 588716 | 1,75 Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methyl-5-ethylpyrazine \$\$ 2-Ethyl-5-methylpyra |
| 22 | 19.541 | 19.495 | 19.615 | 951246 | 2,83 Pyrazine, trimethyl- (CAS) \$\$ Trimethylpyrazine \$\$ 2,3,5-Trimethylpyrazine \$\$ 2,3,6-Tr |
| 23 | 20.971 | 20.860 | 21.075 | 256086 | 0,76 Pyrazine, 2-ethenyl-5-methyl- (CAS) \$\$ METHYL-2-VINYL-5-PYRAZINE \$\$ 2-Methy |
| 24 | 21.201 | 21.145 | 21.280 | 86118 | 0,24 Sec-butyl acetate |
| 25 | 21.384 | 21.335 | 21.430 | 148551 | 0,44 Benzeneacetaldehyde (CAS) \$\$ Hyacinthin \$\$ Phenylethanal \$\$ Phenylacetaldehyde \$\$. |

| | | | | | |
|----|--------|--------|--------|----------|---|
| 26 | 21.574 | 21.535 | 21.615 | 81256 | 0,24 Beta ocimene |
| 27 | 21.995 | 21.935 | 22.040 | 378492 | 1,13 MESO-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 28 | 22.303 | 22.255 | 22.350 | 691313 | 2,06 Acetophenone \$\$ Phenyl methyl ketone |
| 29 | 22.500 | 22.435 | 22.550 | 110211 | 0,33 D,L-2,3-BUTANDIOL DIACETATE \$\$ 2,3-Butanedioldiacetate \$\$ 2,3-BUTANEDIOL, |
| 30 | 22.704 | 22.640 | 22.790 | 1352781 | 4,03 Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (CAS) |
| 31 | 23.011 | 22.955 | 23.065 | 711549 | 2,12 Pyrazine, tetramethyl- (CAS) |
| 32 | 23.385 | 23.335 | 23.415 | 312598 | 0,93 2-nonanone |
| 33 | 23.695 | 23.660 | 23.735 | 589346 | 1,76 2-Isopropyl-5-methylhex-2-enal \$\$ 2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal \$\$ 2-Hexenal, 5-met |
| 34 | 24.368 | 24.310 | 24.470 | 625897 | 1,86 Benzeneethanol (CAS) \$\$ Phenethyl alcohol (CAS) \$\$ PEA \$\$ PHENETHYL ALCOLH |
| 35 | 25.463 | 25.405 | 25.510 | 599671 | 1,79 trans Isomenthone |
| 36 | 25.674 | 25.620 | 25.725 | 450713 | 1,34 2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine \$\$ 2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine |
| 37 | 25.816 | 25.760 | 25.875 | 699872 | 2,08 cis- Isomenthone |
| 38 | 26.791 | 26.755 | 26.825 | 305189 | 0,91 Ethyl caprylate \$\$ Ethyl octanoate |
| 39 | 27.671 | 27.640 | 27.710 | 81621 | 0,24 Butanoic acid, 2-methyl-3-oxo-, methyl ester \$\$ Acetoacetic acid, 2-methyl-, methyl ester |
| 40 | 28.334 | 28.280 | 28.380 | 125487 | 0,37 acetic acid, 2-phenylethyl ester \$\$ phenethyl alcohol, acetate |
| 41 | 28.450 | 28.415 | 28.480 | 413828 | 1,23 Benzeneacetic acid, ethyl ester \$\$ Acetic acid, phenyl-, ethyl ester \$\$.alpha.-Toluic acid, |
| 42 | 28.847 | 28.790 | 28.895 | 142609 | 0,42 2-Butenal-2-phenyl |
| 43 | 29.420 | 29.375 | 29.475 | 208416 | 0,62 2-Indano[2,1-d]1,3-dioxane |
| 44 | 30.577 | 30.530 | 30.620 | 199875 | 0,60 Pyrazine, 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)- \$\$ Pyrazine, 3-isopentyl-2,5-dimethyl |
| 45 | 35.735 | 35.675 | 35.780 | 253431 | 0,75 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal |
| | | | | 33332626 | 100,00 |

DIA 2

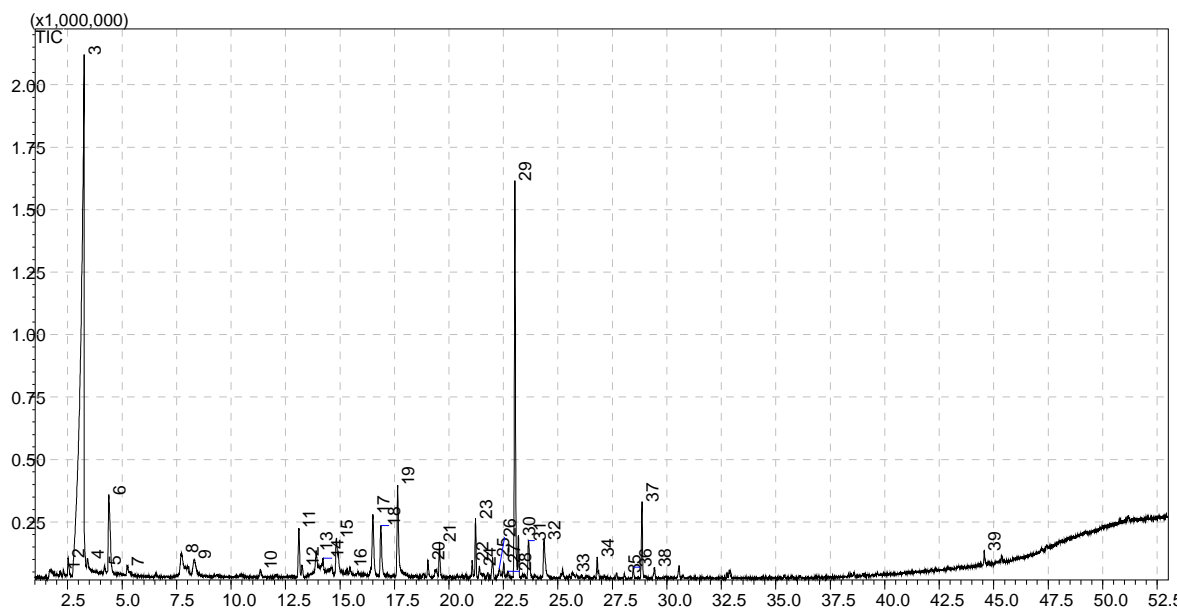
| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area | Area% | Name |
|-------|--------|--------|--------|----------|-------|---|
| 1 | 2,034 | 1,903 | 2,211 | 2820214 | 7,31 | 2-Propanol (CAS) \$\$ Isopropyl alcohol (CAS) \$\$ PRO \$\$ Propan-2-ol |
| 2 | 3,157 | 2,779 | 3,274 | 15828828 | 41,00 | Acetic acid (CAS) \$\$ Ethylic acid \$\$ Vinegar acid \$\$ Ethanoic acid |
| 3 | 3,253 | 3,134 | 3,419 | 507142 | 1,31 | Butanal, 3-methyl- (CAS) \$\$ 3-Methylbutanal |
| 4 | 3,397 | 3,284 | 3,584 | 79543 | 0,21 | Butanal, 2-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methylbutanal \$\$ ISOVALERALDEHYDE (2-METHYL |
| 5 | 4,424 | 4,269 | 4,634 | 600725 | 1,56 | 3-hydroxy-2-butanone |
| 6 | 7,725 | 7,534 | 7,919 | 845942 | 2,19 | 2,3-BUTANEDIOL \$\$ BUTANE-2,3-DIOL \$\$ 2,3-BUTANDIOL \$\$ 2,3-BUTYLENE G |
| 7 | 8,300 | 8,209 | 8,474 | 586984 | 1,52 | 1,3-Butanediol \$\$ Butane-2,3-diol \$\$ Dimethylethylene glycol |
| 8 | 9,240 | 9,124 | 9,389 | 777725 | 2,01 | Pyrazine, methyl- (CAS) |
| 9 | 12,525 | 12,394 | 12,729 | 172519 | 0,45 | 2-Furanmethanol (CAS) |
| 10 | 14,810 | 14,684 | 14,934 | 176367 | 0,46 | 2-HEPTANOL \$\$ HEPTAN-2-OL \$\$ 1-METHYLHEXANOL \$\$ 2-HEPTANOL (NATU |
| 11 | 14,969 | 14,849 | 15,239 | 943542 | 2,44 | Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) |
| 12 | 15,245 | 15,134 | 15,409 | 99085 | 0,26 | gamma Butyrolactone |
| 13 | 15,408 | 15,299 | 15,569 | 127043 | 0,33 | Pyrazine, 2,3-dimethyl- \$\$ 2,3-Dimethylpyrazine \$\$ 2,3-Dimethyl pyrazine |
| 14 | 16,480 | 16,334 | 16,644 | 949229 | 2,46 | Ethyl Butanoate |
| 15 | 16,844 | 16,709 | 17,044 | 881452 | 2,28 | Acetic acid, ethyl ester (CAS) |
| 16 | 17,611 | 17,479 | 17,834 | 492251 | 1,28 | Benzaldehyde (CAS) |
| 17 | 17,825 | 17,719 | 17,969 | 326402 | 0,85 | 5-methyl furfural \$\$ 2-FURANCARBOXALDEHYDE, 5-METHYL- \$\$ 5-METHYLF |
| 18 | 19,116 | 18,979 | 19,274 | 186485 | 0,48 | BENZENE, 1,2,4-TRIMETHYL- |
| 19 | 19,339 | 19,199 | 19,489 | 280167 | 0,73 | Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl. |
| 20 | 19,441 | 19,339 | 19,564 | 735546 | 1,91 | Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methyl-5-ethylpyrazine |
| 21 | 19,520 | 19,404 | 19,699 | 899876 | 2,33 | Pyrazine, trimethyl- (CAS) \$\$ Trimethylpyrazine |
| 22 | 20,95 | 20,769 | 21,159 | 250497 | 0,65 | Pyrazine, 2-ethenyl-5-methyl- (CAS) |
| 23 | 21,180 | 21,054 | 21,364 | 100948 | 0,26 | Sec-butyl acetate |
| 24 | 21,363 | 21,244 | 21,514 | 175381 | 0,45 | Benzeneacetaldehyde (CAS) \$\$ Hyacinthin \$\$ Phenylethanal |
| 25 | 21,553 | 21,444 | 21,699 | 100086 | 0,26 | Beta ocimene |
| 26 | 21,974 | 21,844 | 22,124 | 455322 | 1,18 | MESO-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 27 | 22,282 | 22,164 | 22,434 | 879143 | 2,28 | Acetophenone \$\$ Phenyl methyl ketone |
| 28 | 22,479 | 22,344 | 22,634 | 137041 | 0,35 | D,L-2,3-BUTANDIOL DIACETATE \$\$ 2,3-Butanedioldiacetate \$\$ 2,3-BUTANEDIOL, |
| 29 | 22,683 | 22,549 | 22,874 | 1699611 | 4,40 | Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (CAS) |
| 30 | 22,990 | 22,864 | 23,149 | 798379 | 2,07 | Pyrazine, tetramethyl- (CAS) |
| 31 | 23,364 | 23,244 | 23,499 | 400428 | 1,04 | 2-nonanone |
| 32 | 23,674 | 23,569 | 23,819 | 616176 | 1,60 | 2-Isopropyl-5-methylhex-2-enal \$\$ 2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal |
| 33 | 24,347 | 24,219 | 24,554 | 742727 | 1,92 | Benzeneethanol (CAS) \$\$ Phenethyl alcohol (CAS) |
| 34 | 25,442 | 25,314 | 25,594 | 646501 | 1,67 | trans Isomenthone |
| 35 | 25,653 | 25,529 | 25,809 | 577543 | 1,50 | 2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine \$\$ 2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine |
| 36 | 25,795 | 25,669 | 25,959 | 726702 | 1,88 | cis- Isomenthone |
| 37 | 26,770 | 26,664 | 26,909 | 395019 | 1,02 | Ethyl caprylate \$\$ Ethyl octanoate |

| | | | | | | |
|----|--------|--------|--------|----------|--------|---|
| 38 | 27,65 | 27,549 | 27,794 | 76032 | 0,20 | Acetoacetic acid, 2-methyl-, methyl ester |
| 39 | 28,313 | 28,189 | 28,464 | 119898 | 0,31 | acetic acid, 2-phenylethyl ester \$\$ phenethyl alcohol, acetate |
| 40 | 28,429 | 28,324 | 28,564 | 480658 | 1,25 | Benzeneacetic acid, ethyl ester \$\$ Acetic acid, phenyl-, ethyl ester |
| 41 | 28,826 | 28,699 | 28,979 | 179439 | 0,46 | 2-Butenal-2-phenyl |
| 42 | 29,399 | 29,284 | 29,559 | 202827 | 0,53 | 2-Indano[2,1-d]1,3-dioxane |
| 43 | 30,556 | 30,439 | 30,704 | 226705 | 0,59 | Pyrazine, 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)- \$\$ Pyrazine, 3-isopentyl-2,5-dimethyl |
| 44 | 35,646 | 35,584 | 35,864 | 299261 | 0,78 | 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal |
| | | | | 38603391 | 100,00 | |

DIA 3

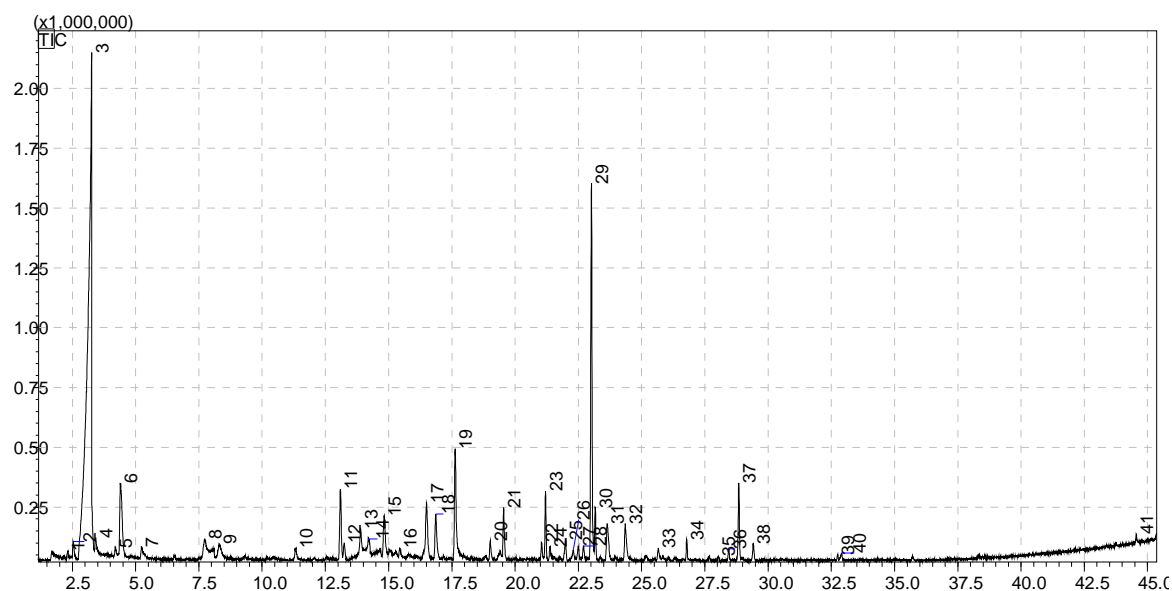
| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area | Area% | Name |
|-------|--------|--------|--------|----------|--------|--|
| 1 | 2,100 | 2,265 | 2,192 | 2606726 | 7,31 | 2-Propanol (CAS) \$\$ Isopropyl alcohol (CAS) \$\$ PRO |
| 2 | 3,223 | 3,328 | 3,255 | 14715340 | 41,28 | Acetic acid (CAS) \$\$ Ethylic acid |
| 3 | 3,319 | 3,473 | 3,400 | 463654 | 1,30 | Butanal, 3-methyl- (CAS) \$\$ 3-Methylbutanal |
| 4 | 3,463 | 3,638 | 3,565 | 77055 | 0,22 | Butanal, 2-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methylbutanal |
| 5 | 4,490 | 4,688 | 4,615 | 543237 | 1,52 | 3-hydroxy-2-butanone |
| 6 | 7,791 | 7,973 | 7,900 | 732454 | 2,05 | 2,3-BUTANEDIOL \$\$ BUTANE-2,3-DIOL \$\$ 2,3-BUTANDIOL |
| 7 | 8,386 | 8,528 | 8,455 | 523496 | 1,47 | 1,3-Butanediol \$\$ Butane-2,3-diol \$\$ Dimethylethylene glycol |
| 8 | 9,306 | 9,443 | 9,370 | 774237 | 2,17 | Pyrazine, methyl- (CAS) \$\$ Methylpyrazine \$\$ METHYL-1,4-DIAZINE |
| 9 | 12,591 | 12,783 | 12,710 | 159031 | 0,45 | 2-Furanmethanol (CAS) |
| 10 | 14,876 | 14,988 | 14,915 | 152879 | 0,43 | 2-HEPTANOL \$\$ HEPTAN-2-OL \$\$ 1-METHYLHEXANOL |
| 11 | 15,135 | 15,293 | 15,220 | 930054 | 2,61 | Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) \$\$ 2,5-Dimethylpyrazine |
| 12 | 15,311 | 15,463 | 15,390 | 95597 | 0,27 | gamma Butyrolactone |
| 13 | 15,474 | 15,623 | 15,550 | 113555 | 0,32 | Pyrazine, 2,3-dimethyl- \$\$ 2,3-Dimethylpyrazine \$\$ 2,3-Dimethyl pyrazine |
| 14 | 16,546 | 16,698 | 16,625 | 885741 | 2,48 | Ethyl Butanoate |
| 15 | 16,910 | 17,098 | 17,025 | 967964 | 2,72 | Acetic acid, ethyl ester (CAS) |
| 16 | 17,677 | 17,888 | 17,815 | 408063 | 1,14 | Benzaldehyde (CAS) |
| 17 | 17,891 | 18,023 | 17,950 | 312914 | 0,88 | 5-methyl furfural \$\$ 2-FURANCARBOXALDEHYDE, 5-METHYL- |
| 18 | 19,401 | 19,543 | 19,470 | 286679 | 0,80 | Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl. |
| 19 | 19,513 | 19,618 | 19,545 | 602058 | 1,69 | Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl- (CAS) \$\$ 2-Methyl-5-ethylpyrazine |
| 20 | 19,597 | 19,753 | 19,680 | 999588 | 2,80 | Pyrazine, trimethyl- (CAS) \$\$ Trimethylpyrazine |
| 21 | 20,956 | 21,213 | 21,14 | 269428 | 0,76 | Pyrazine, 2-ethenyl-5-methyl- (CAS) |
| 22 | 21,280 | 21,418 | 21,345 | 99460 | 0,28 | Sec-butyl acetate |
| 23 | 21,488 | 21,668 | 21,595 | 161893 | 0,45 | Benzeneacetaldehyde (CAS) \$\$ Hyacinthin \$\$ Phenylethanal |
| 24 | 21,702 | 21,853 | 21,780 | 94598 | 0,27 | Beta ocimene |
| 25 | 22,155 | 22,278 | 22,205 | 391834 | 1,10 | MESO-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 26 | 22,375 | 22,488 | 22,415 | 734655 | 2,06 | Acetophenone \$\$ Phenyl methyl ketone |
| 27 | 22,556 | 22,688 | 22,615 | 123553 | 0,35 | D,L-2,3-BUTANDIOL DIACETATE \$\$ 2,3-Butanedioldiacetate |
| 28 | 22,778 | 22,928 | 22,855 | 1386123 | 3,89 | Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (CAS) |
| 29 | 23,065 | 23,203 | 23,130 | 724891 | 2,03 | Pyrazine, tetramethyl- (CAS) |
| 30 | 23,498 | 23,653 | 23,580 | 385940 | 1,08 | 2-nonanone |
| 31 | 23,804 | 23,938 | 23,865 | 662688 | 1,86 | 2-Isopropyl-5-methylhex-2-enal \$\$ 2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal |
| 32 | 24,443 | 24,608 | 24,535 | 639239 | 1,79 | Benzeneethanol (CAS) \$\$ Phenethyl alcohol (CAS) |
| 33 | 25,490 | 25,648 | 25,575 | 693013 | 1,94 | trans Isomenthone |
| 34 | 25,721 | 25,863 | 25,790 | 494055 | 1,39 | 2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine \$\$ 2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine |
| 35 | 25,902 | 26,013 | 25,940 | 793214 | 2,22 | cis- Isomenthone |
| 36 | 26,875 | 27,055 | 26,982 | 348531 | 0,98 | Ethyl caprylate \$\$ Ethyl octanoate |
| 37 | 27,572 | 27,413 | 27,775 | 94963 | 0,27 | Butanoic acid, 2-methyl-3-oxo-, methyl ester |
| 38 | 28,397 | 28,518 | 28,445 | 138829 | 0,39 | acetic acid, 2-phenylethyl ester \$\$ phenethyl alcohol, acetate |
| 39 | 28,379 | 28,288 | 28,545 | 427170 | 1,20 | Benzeneacetic acid, ethyl ester \$\$ Acetic acid, phenyl-, ethyl esterd, |
| 40 | 28,495 | 28,393 | 28,660 | 155951 | 0,44 | 2-Butenal-2-phenyl |
| 41 | 30,513 | 30,408 | 30,685 | 213217 | 0,60 | Pyrazine, 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)- |
| 42 | 35,601 | 35,523 | 35,845 | 266773 | 0,75 | 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal |
| | | | | 35650340 | 100,00 | |

ANEXO E. Cromatograma del cacao regional fermentado 5 días R-5 por GC-MS



| Peak Report TIC | | | | | | |
|-----------------|---------|---------|---------|----------|--------|---|
| Peak# | R. Time | I. Time | F. Time | Area | Area% | Name |
| 1 | 2.314 | 2.270 | 2.370 | 73416 | 0.20 | Propanal, 2-methyl- (CAS) \$ \$ Isobutanol \$ \$ Isobutyraldehyde (CAS) \$ \$ 2-Methylpropan |
| 2 | 2.526 | 2.485 | 2.600 | 229752 | 0.63 | 2,3-Butanedione (CAS) \$ \$ Diacetyl \$ \$ Butanedione \$ \$ 2,3-Butadione \$ \$ Du |
| 3 | 3.258 | 2.790 | 3.265 | 17893420 | 49.04 | Acetic acid (CAS) \$ \$ Ethylic acid \$ \$ Vinegar acid \$ \$ Ethanoic acid \$ \$ Glacial acetic acid |
| 4 | 3.417 | 3.375 | 3.470 | 111000 | 0.30 | Butanal, 2-methyl- (CAS) \$ \$ 2-Methylbutanal \$ \$ ISOVALERALDEHYDE (2-METHYL |
| 5 | 4.195 | 4.155 | 4.225 | 51992 | 0.14 | 2-Pentanol \$ \$ sec-Amyl alcohol \$ \$ sec-Pentanol \$ \$ Methylpropylcarbinol \$ \$ 1-Methyl-1 |
| 6 | 4.391 | 4.350 | 4.530 | 1521505 | 4.17 | 2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS) \$ \$ Acetoin \$ \$ 3-Hydroxy-2-butanone \$ \$ Dimethylketol ! |
| 7 | 5.236 | 5.190 | 5.295 | 110244 | 0.30 | 1-Butanol, 3-methyl- (impure) (CAS) \$ \$ 3-Methyl-1-butanol \$ \$ Isopentanol \$ \$ 3-Methyl |
| 8 | 7.723 | 7.615 | 7.845 | 506597 | 1.39 | 2,3-Butanediol (CAS) \$ \$ Butane-2,3-diol \$ \$ 2,3-BUTANDIOL \$ \$ 2,3-Butylene glycol \$ |
| 9 | 8.314 | 8.195 | 8.460 | 493619 | 1.35 | 1,3-Butanediol (CAS) \$ \$ 1,3-Butylene glycol \$ \$ 1,3-Dihydroxybutane \$ \$.beta.-Butylene |
| 10 | 11.348 | 11.285 | 11.400 | 100086 | 0.27 | 2-Pentanol, acetate (CAS) \$ \$ 2-Pentyl acetate \$ \$ 2-Acetoxy-pentane \$ \$ 1-Methylbutyl ac |
| 11 | 13.110 | 13.050 | 13.190 | 754020 | 2.07 | 1-Butanol, 3-methyl-, acetate (CAS) \$ \$ Isoamyl acetate \$ \$ 3-METHYL BUTYL ACETA |
| 12 | 13.264 | 13.215 | 13.310 | 112617 | 0.31 | 1-Butanol, 2-methyl-, acetate (CAS) \$ \$ 2-Methylbutyl acetate \$ \$ 2-METHYL-1-ACETO |
| 13 | 13.902 | 13.835 | 13.995 | 320289 | 0.88 | 2-Heptanone \$ \$ n-Amyl methyl ketone \$ \$ n-Pentyl methyl ketone \$ \$ Amyl methyl keton |
| 14 | 14.224 | 14.170 | 14.265 | 114038 | 0.31 | Acetic acid, 1-methylethyl ester (CAS) \$ \$ Isopropyl acetate \$ \$ 2-Acetoxypropane \$ \$ 2-P |
| 15 | 14.843 | 14.775 | 14.880 | 322134 | 0.88 | 2-Heptanol (CAS) \$ \$ 2-Hydroxyheptane \$ \$ s-Heptyl alcohol \$ \$ 2-Heptyl alcohol \$ \$ Am |
| 16 | 15.451 | 15.415 | 15.520 | 85023 | 0.23 | Pyrazine, 2,3-dimethyl- (CAS) |
| 17 | 16.515 | 16.440 | 16.600 | 973863 | 2.67 | Ethanol, 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]-, acetate (CAS) \$ \$ Methoxytriglycol acetate \$ \$ |
| 18 | 16.872 | 16.810 | 16.955 | 768595 | 2.11 | 1-Methoxy-2-propyl ester of acetic acid \$ \$ 1-Methoxy-2-propyl acetate \$ \$ 2-Propanol, 1- |
| 19 | 17.646 | 17.585 | 17.730 | 1351071 | 3.70 | Benzaldehyde (CAS) \$ \$ Phenylmethanal \$ \$ Benzenecarbal \$ \$ Benzaldehyde FFC \$ \$ |
| 20 | 19.035 | 18.995 | 19.080 | 153432 | 0.42 | .beta.-Myrcene \$ \$ 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- (CAS) \$ \$ 2-Methyl-6-methylen |
| 21 | 19.565 | 19.520 | 19.615 | 370521 | 1.02 | Pyrazine, trimethyl- (CAS) \$ \$ Trimethylpyrazine \$ \$ 2,3,5-Trimethylpyrazine \$ \$ 2,3,6-Tri |
| 22 | 21.062 | 21.020 | 21.115 | 168605 | 0.46 | trans-.beta.-Ocimene \$ \$ 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- \$ \$.beta.-trans-Ocimene \$ \$ |
| 23 | 21.220 | 21.165 | 21.275 | 681003 | 1.87 | Acetic acid, 1-methylpropyl ester (CAS) \$ \$ 2-Butyl acetate \$ \$ sec-Butyl acetate \$ \$ sec-B |
| 24 | 21.400 | 21.350 | 21.435 | 106037 | 0.29 | Benzeneacetaldehyde (CAS) \$ \$ Hyacinthin \$ \$ Phenylethanal \$ \$ Phenylacetaldehyde \$ \$ |
| 25 | 22.000 | 21.925 | 22.060 | 284604 | 0.78 | MESO-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 26 | 22.311 | 22.245 | 22.370 | 95880 | 0.26 | Ethanone, 1-phenyl- (CAS) \$ \$ Acetophenone \$ \$ Phenyl methyl ketone \$ \$ Hypon \$ \$ Hy |
| 27 | 22.516 | 22.460 | 22.565 | 141538 | 0.39 | D,L-2,3-BUTANDIOL DIACETATE \$ \$ 2,3-Butanedioldiacetate \$ \$ 2,3-BUTANEDIOL, |
| 28 | 22.721 | 22.655 | 22.780 | 90975 | 0.25 | Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)- (CAS) \$ \$ 2-Acetylpyrrole \$ \$ Methyl pyrrol-2-yl ketone \$ |
| 29 | 23.026 | 22.950 | 23.125 | 5393162 | 14.78 | Pyrazine, tetramethyl- (CAS) \$ \$ Tetramethylpyrazine \$ \$ BS factor \$ \$ 2,3,5,6-Tetrameth |
| 30 | 23.188 | 23.145 | 23.225 | 364763 | 1.00 | 2-Nonanone (CAS) \$ \$ Methyl heptyl ketone \$ \$ Nonan-2-one \$ \$ Heptyl methyl ketone \$ |
| 31 | 23.650 | 23.590 | 23.750 | 670706 | 1.84 | ALPHA-TERPINOLENE \$ \$ Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- (CAS) \$ \$ |
| 32 | 24.368 | 24.305 | 24.455 | 600179 | 1.64 | Benzeneethanol (CAS) \$ \$ Phenethyl alcohol (CAS) \$ \$ PEA \$ \$ PHENETHYL ALCOHOL |
| 33 | 25.673 | 25.620 | 25.710 | 49491 | 0.14 | 2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine \$ \$ 2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine \$ \$ 2-ETHYL-3,5,6- |
| 34 | 26.803 | 26.760 | 26.835 | 169704 | 0.47 | OCTANOIC ACID, ETHYL ESTER \$ \$ CAPRYLIC ACID ETHYL ESTER \$ \$ ETHYL |
| 35 | 28.041 | 28.000 | 28.090 | 58186 | 0.16 | 2-Octanol, acetate (CAS) \$ \$ 2-Octyl acetate \$ \$ 1-Methylethyl acetate \$ \$ 2-Octanol acet |
| 36 | 28.456 | 28.410 | 28.505 | 111064 | 0.30 | Benzeneacetic acid, ethyl ester (CAS) \$ \$ Ethyl phenylacetate \$ \$ 4-ETHYLPHENYL AC |
| 37 | 28.857 | 28.800 | 28.915 | 910983 | 2.50 | ACETIC ACID, 2-PHENYLETHYL ESTER \$ \$ PHENETHYL ALCOHOL, ACETATE \$ |
| 38 | 29.426 | 29.395 | 29.475 | 80557 | 0.22 | Benzeneacetaldehyde, alpha-ethylidene- (CAS) \$ \$ 2-Phenyl-2-butenal \$ \$ 2-PHENYLB |
| 39 | 44.564 | 44.525 | 44.595 | 91669 | 0.25 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester (CAS) \$ \$ N-BUTYL ISOBUT |
| | | | | 36486340 | 100.00 | |

ANEXO F. Cromatograma del cacao regional fermentado 6 días R-6 por GC-MS



| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area | Area% | Peak Report TIC |
|-------|--------|--------|--------|----------|--------|---|
| 1 | 2.316 | 2.270 | 2.375 | 99745 | 0.24 | PROPANAL, 2-METHYL- |
| 2 | 2.536 | 2.490 | 2.620 | 241818 | 0.57 | 2,3-Butanedione (CAS) |
| 3 | 3.263 | 2.740 | 3.325 | 20587004 | 48.77 | Acetic acid (CAS) \$ \$ Ethylic acid \$ \$ Vinegar acid |
| 4 | 3.422 | 3.385 | 3.475 | 130428 | 0.31 | Butanal, 2-methyl- (CAS) \$ \$ 2-Methylbutanal \$ \$ ISOVALERALDEHYDE |
| 5 | 4.192 | 4.155 | 4.255 | 94090 | 0.22 | 2-Pentanol (CAS) \$ \$ Pentan-2-ol \$ \$ 1-Methylbutanol \$ \$ 2-Pentyl alcohol |
| 6 | 4.400 | 4.350 | 4.545 | 1695254 | 4.02 | 2-Butanone, 3-hydroxy- (CAS) \$ \$ Acetoin \$ \$ 3-Hydroxy-2-butanone \$ \$ Dimethylketol |
| 7 | 5.239 | 5.175 | 5.325 | 169449 | 0.40 | 3-Methyl-1-butanol \$ \$ Isopentanol |
| 8 | 7.738 | 7.645 | 7.820 | 331181 | 0.78 | 2,3-Butanediol \$ \$ Butane-2,3-diol \$ \$ Dimethylethylene glycol |
| 9 | 8.305 | 8.220 | 8.415 | 263021 | 0.62 | 2,3-Butanediol (CAS) \$ \$ Butane-2,3-diol \$ \$ 2,3-BUTANDIOL |
| 10 | 11.327 | 11.245 | 11.405 | 222377 | 0.53 | 2-Pentanol, acetate |
| 11 | 13.098 | 13.030 | 13.170 | 1123553 | 2.66 | 1-Butanol, 3-methyl-, acetate (CAS) \$ \$ Isoamyl acetate |
| 12 | 13.242 | 13.200 | 13.290 | 164535 | 0.39 | 1-Butanol, 2-methyl-, acetate (CAS) \$ \$ 2-Methylbutyl acetate |
| 13 | 13.896 | 13.830 | 13.960 | 346049 | 0.82 | 2-HEPTANONE |
| 14 | 14.199 | 14.165 | 14.275 | 199871 | 0.47 | Isopropyl acetate \$ \$ Acetic acid, 1-methylethyl ester \$ \$ Acetic acid, isopropyl ester |
| 15 | 14.822 | 14.755 | 14.935 | 774083 | 1.83 | Pyrazine, 2,3-dimethyl- (CAS) \$ \$ 2,3-Dimethylpyrazine \$ \$ 2,3-dimethyl pyrazine \$ \$ PY |
| 16 | 15.444 | 15.400 | 15.520 | 128426 | 0.30 | Pyrazine, 2,3-dimethyl- (CAS) |
| 17 | 16.500 | 16.425 | 16.590 | 917022 | 2.17 | Acetic acid, ethyl ester (CAS) \$ \$ Acetic acid ethyl ester (CAS) \$ \$ Ethyl acetate \$ \$ Acetic |
| 18 | 16.862 | 16.800 | 16.965 | 772898 | 1.83 | Acetic acid, ethyl ester (CAS) \$ \$ Acetic acid ethyl ester (CAS) \$ \$ Ethyl acetate \$ \$ Acetic |
| 19 | 17.632 | 17.565 | 17.720 | 1752553 | 4.15 | Benzaldehyde (CAS) \$ \$ Phenylmethanal \$ \$ Benzenecarbonal \$ \$ Benzaldehyde FFC \$ \$ |
| 20 | 19.022 | 18.970 | 19.090 | 255789 | 0.61 | beta-Myrcene \$ \$ 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- (CAS) \$ \$ 2-Methyl-6-methylene |
| 21 | 19.546 | 19.500 | 19.610 | 617419 | 1.46 | Pyrazine, trimethyl- (CAS) \$ \$ Trimethylpyrazine \$ \$ 2,3,5-Trimethylpyrazine \$ \$ 2,3,6-Tr |
| 22 | 21.046 | 21.010 | 21.085 | 155435 | 0.37 | trans-beta-Ocimene \$ \$ 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- \$ \$.beta.-trans-Ocimene |
| 23 | 21.204 | 21.160 | 21.250 | 707845 | 1.68 | Acetic acid, 1-methylpropyl ester (CAS) \$ \$ 2-Butyl acetate \$ \$ sec-Butyl acetate \$ \$ sec-F |
| 24 | 21.383 | 21.340 | 21.420 | 112678 | 0.27 | Benzenecetaldehyde (CAS) \$ \$ Hyacinthin \$ \$ Phenylethanal \$ \$ Phenylacetaldehyde \$ \$ |
| 25 | 21.989 | 21.920 | 22.045 | 289184 | 0.69 | D,L-2,3-BUTANDIOL DIACETATE \$ \$ 2,3-Butanedioldiacetate \$ \$ 2,3-BUTANEDIOL |
| 26 | 22.299 | 22.225 | 22.360 | 117109 | 0.28 | Ethanone, 1-phenyl- (CAS) \$ \$ Acetophenone |
| 27 | 22.504 | 22.440 | 22.560 | 184168 | 0.44 | MESO-2,3-BUTANDIOL DIACETATE |
| 28 | 22.703 | 22.625 | 22.775 | 213803 | 0.51 | Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)- (CAS) |
| 29 | 23.019 | 22.940 | 23.110 | 5372646 | 12.73 | Pyrazine, tetramethyl- (CAS) \$ \$ Tetramethylpyrazine \$ \$ BS factor \$ \$ 2,3,5,6-Tetrametr |
| 30 | 23.167 | 23.120 | 23.220 | 555279 | 1.32 | 2-Nonanone (CAS) \$ \$ Methyl heptyl ketone \$ \$ Nonan-2-one \$ \$ Heptyl methyl ketone \$ \$ |
| 31 | 23.642 | 23.565 | 23.765 | 833509 | 1.97 | ALPHA-TERPINOLENE \$ \$ Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- (CAS) |
| 32 | 24.355 | 24.275 | 24.475 | 730370 | 1.73 | Benzenethanol (CAS) \$ \$ Phenethyl alcohol (CAS) \$ \$ PEA \$ \$ PHENETHYL ALCOHOL |
| 33 | 25.664 | 25.605 | 25.735 | 166175 | 0.39 | : 2-[1,2-Dihydroxyethyl]-9-[beta.-d-ribofuranosyl]purine |
| 34 | 26.785 | 26.740 | 26.830 | 222088 | 0.53 | Octanoic acid, ethyl ester \$ \$ Ethyl caprylate \$ \$ Ethyl octanoate \$ \$ Ethyl octoate \$ \$ Ethy |
| 35 | 28.026 | 27.995 | 28.070 | 50864 | 0.12 | 2-Octanol, acetate (CAS) \$ \$ 2-Octyl acetate \$ \$ 1-Methylheptyl acetate |
| 36 | 28.447 | 28.395 | 28.495 | 134270 | 0.32 | Benzenecacetic acid, ethyl ester (CAS) \$ \$ Ethyl phenylacetate |
| 37 | 28.841 | 28.785 | 28.910 | 1015144 | 2.40 | ACETIC ACID, 2-PHENYLETHYL ESTER |
| 38 | 29.412 | 29.365 | 29.470 | 218723 | 0.52 | Benzenecetaldehyde, alpha-ethylidene- (CAS) |
| 39 | 32.745 | 32.700 | 32.790 | 57343 | 0.14 | Decanoic acid, ethyl ester (CAS) \$ \$ Ethyl decanoate \$ \$ Ethyl caprate |
| 40 | 32.909 | 32.830 | 32.955 | 94552 | 0.22 | ISO AMYL BENZOATE |
| 41 | 44.549 | 44.520 | 44.605 | 93583 | 0.22 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (CAS) \$ \$ Butyl phthalate \$ \$ DI-N-BUTYLP |
| | | | | 42211333 | 100.00 | |

ANEXO G. Diferencias estimadas entre cada par de medias entre los 31 compuestos comunes en las dos muestras de cacao regional.

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|---|-------------|-------------------|--------------------|
| 1,3-butanediol - 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina | | 270975, | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2,3-butanediol | | -24897,0 | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2,3-butanodiona | | 158499, | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2,3-dimetil-pirazina | | -243427, | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2-Heptanol | | -371850, | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2-Heptanona | | 7585,0 | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2-acetil-pirrol | | 214367, | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2-fenil-2-butenal | | 176404, | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2-metil butanal | | 252451, | 382275, |
| 1,3-butanediol - 2-nonanona | | -158023, | 382275, |
| 1,3-butanediol - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,30452E6 | 382275, |
| 1,3-butanediol - 3-metil-1-butanol | | 246645, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Acetato de 2-fenil etilo | * | -606894, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Acetato de 2-metil-butanol | | 195790, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Acetato de isoamil | * | -689824, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Acetato de sec- butilo | * | -456375, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Acetofenona | | 255921, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Acido acetico | * | -1,97491E7 | 382275, |
| 1,3-butanediol - Alfa.TERPINOLENO | * | -451476, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Bencen acetaldehido | | 236070, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Bencen etanol | * | -391210, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Benzaldehido | * | -1,454E6 | 382275, |
| 1,3-butanediol - Beta-MYRCENO | | 124795, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Beta-OCIMENO | | 177169, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Caprilato de etilo | | 152925, | 382275, |
| 1,3-butanediol - D,L-diacetato de 2,3-butandiol | | 54138,5 | 382275, |
| 1,3-butanediol - Fenil acetato de etilo | | -36214,0 | 382275, |
| 1,3-butanediol - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 195339, | 382275, |
| 1,3-butanediol - Tetrametil pirazina | * | -5,30786E6 | 382275, |
| 1,3-butanediol - Trimetil pirazina | | -189207, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2,3-butanediol | | -295872, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2,3-butanodiona | | -112476, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2,3-dimetil-pirazina | * | -514402, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2-Heptanol | * | -642825, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2-Heptanona | | -263390, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2-acetil-pirrol | | -56608,5 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2-fenil-2-butenal | | -94571,5 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2-metil butanal | | -18524,0 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 2-nonanona | * | -428998, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,57549E6 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - 3-metil-1-butanol | | -24330,5 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Acetato de 2-fenil etilo | * | -877869, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Acetato de 2-metil-butanol | | -75185,0 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Acetato de isoamil | * | -960799, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Acetato de sec- butilo | * | -727350, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Acetofenona | | -15054,5 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Acido acetico | * | -2,00201E7 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Alfa.TERPINOLENO | * | -722451, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Bencen acetaldehido | | -34905,0 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Bencen etanol | * | -662185, | 382275, |

| | | | |
|--|---|------------|---------|
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Benzaldehido | * | -1,72497E6 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Beta-MYRCENO | | -146181, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Beta-OCIMENO | | -93806,0 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Caprilato de etilo | | -118050, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -216837, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Fenil acetato de etilo | | -307189, | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | -75636,0 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Tetrametil pirazina | * | -5,57883E6 | 382275, |
| 2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina - Trimetil pirazina | * | -460182, | 382275, |
| 2,3-butanediol - 2,3-butanodiona | | 183396, | 382275, |
| 2,3-butanediol - 2,3-dimetil-pirazina | | -218530, | 382275, |
| 2,3-butanediol - 2-Heptanol | | -346953, | 382275, |
| 2,3-butanediol - 2-Heptanona | | 32482,0 | 382275, |
| 2,3-butanediol - 2-acetil-pirrol | | 239264, | 382275, |
| 2,3-butanediol - 2-fenil-2-butenal | | 201301, | 382275, |
| 2,3-butanediol - 2-metil butanal | | 277348, | 382275, |
| 2,3-butanediol - 2-nonanona | | -133126, | 382275, |
| 2,3-butanediol - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,27962E6 | 382275, |
| 2,3-butanediol - 3-metil-1-butanol | | 271542, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Acetato de 2-fenil etilo | * | -581997, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Acetato de 2-metil-butanol | | 220687, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Acetato de isoamil | * | -664927, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Acetato de sec- butilo | * | -431478, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Acetofenona | | 280818, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Acido acetico | * | -1,97242E7 | 382275, |
| 2,3-butanediol - Alfa.TERPINOLENO | * | -426579, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Bencen acetaldehido | | 260967, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Bencen etanol | | -366313, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Benzaldehido | * | -1,4291E6 | 382275, |
| 2,3-butanediol - Beta-MYRCENO | | 149692, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Beta-OCIMENO | | 202066, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Caprilato de etilo | | 177822, | 382275, |
| 2,3-butanediol - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | 79035,5 | 382275, |
| 2,3-butanediol - Fenil acetato de etilo | | -11317,0 | 382275, |
| 2,3-butanediol - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 220236, | 382275, |
| 2,3-butanediol - Tetrametil pirazina | * | -5,28296E6 | 382275, |
| 2,3-butanediol - Trimetil pirazina | | -164310, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 2,3-dimetil-pirazina | * | -401926, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 2-Heptanol | * | -530349, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 2-Heptanona | | -150914, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 2-acetil-pirrol | | 55867,5 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 2-fenil-2-butenal | | 17904,5 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 2-metil butanal | | 93952,0 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 2-nonanona | | -316522, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,46302E6 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - 3-metil-1-butanol | | 88145,5 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Acetato de 2-fenil etilo | * | -765393, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Acetato de 2-metil-butanol | | 37291,0 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Acetato de isoamil | * | -848323, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Acetato de sec- butilo | * | -614874, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Acetofenona | | 97421,5 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Acido acetico | * | -1,99076E7 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Alfa.TERPINOLENO | * | -609975, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Bencen acetaldehido | | 77571,0 | 382275, |

| | | | |
|--|---|------------|---------|
| 2,3-butanodiona - Bencen etanol | * | -549709, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Benzaldehido | * | -1,6125E6 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Beta-MYRCENO | | -33704,5 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Beta-OCIMENO | | 18670,0 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Caprilato de etilo | | -5574,0 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -104361, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Fenil acetato de etilo | | -194713, | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 36840,0 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Tetrametil pirazina | * | -5,46635E6 | 382275, |
| 2,3-butanodiona - Trimetil pirazina | | -347706, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - 2-Heptanol | | -128423, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - 2-Heptanona | | 251012, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - 2-acetil-pirrol | * | 457794, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - 2-fenil-2-butenal | * | 419831, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - 2-metil butanal | * | 495878, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - 2-nonanona | | 85404,5 | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,06109E6 | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - 3-metil-1-butanol | * | 490072, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Acetato de 2-fenil etilo | | -363467, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Acetato de 2-metil-butanol | * | 439217, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Acetato de isoamil | * | -446397, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Acetato de sec- butilo | | -212948, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Acetofenona | * | 499348, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Acido acetico | * | -1,95057E7 | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Alfa.TERPINOLENO | | -208049, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Bencen acetaldehido | * | 479497, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Bencen etanol | | -147783, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Benzaldehido | * | -1,21057E6 | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Beta-MYRCENO | | 368222, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Beta-OCIMENO | * | 420596, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Caprilato de etilo | * | 396352, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | 297566, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Fenil acetato de etilo | | 207213, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 438766, | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Tetrametil pirazina | * | -5,06443E6 | 382275, |
| 2,3-dimetil-pirazina - Trimetil pirazina | | 54220,5 | 382275, |
| 2-Heptanol - 2-Heptanona | | 379435, | 382275, |
| 2-Heptanol - 2-acetil-pirrol | * | 586217, | 382275, |
| 2-Heptanol - 2-fenil-2-butenal | * | 548254, | 382275, |
| 2-Heptanol - 2-metil butanal | * | 624301, | 382275, |
| 2-Heptanol - 2-nonanona | | 213828, | 382275, |
| 2-Heptanol - 3-hidroxi-2-butanona | * | -932670, | 382275, |
| 2-Heptanol - 3-metil-1-butanol | * | 618495, | 382275, |
| 2-Heptanol - Acetato de 2-fenil etilo | | -235044, | 382275, |
| 2-Heptanol - Acetato de 2-metil-butanol | * | 567640, | 382275, |
| 2-Heptanol - Acetato de isoamil | | -317974, | 382275, |
| 2-Heptanol - Acetato de sec- butilo | | -84525,0 | 382275, |
| 2-Heptanol - Acetofenona | * | 627771, | 382275, |
| 2-Heptanol - Acido acetico | * | -1,93773E7 | 382275, |
| 2-Heptanol - Alfa.TERPINOLENO | | -79626,0 | 382275, |
| 2-Heptanol - Bencen acetaldehido | * | 607920, | 382275, |
| 2-Heptanol - Bencen etanol | | -19359,5 | 382275, |
| 2-Heptanol - Benzaldehido | * | -1,08215E6 | 382275, |
| 2-Heptanol - Beta-MYRCENO | * | 496645, | 382275, |

| | | | |
|---|---|------------|---------|
| 2-Heptanol - Beta-OCIMENO | * | 549019, | 382275, |
| 2-Heptanol - Caprilato de etilo | * | 524775, | 382275, |
| 2-Heptanol - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 425989, | 382275, |
| 2-Heptanol - Fenil acetato de etilo | | 335636, | 382275, |
| 2-Heptanol - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 567189, | 382275, |
| 2-Heptanol - Tetrametil pirazina | * | -4,93601E6 | 382275, |
| 2-Heptanol - Trimetil pirazina | | 182644, | 382275, |
| 2-Heptanona - 2-acetil-pirrol | | 206782, | 382275, |
| 2-Heptanona - 2-fenil-2-butenal | | 168819, | 382275, |
| 2-Heptanona - 2-metil butanal | | 244866, | 382275, |
| 2-Heptanona - 2-nonanona | | -165608, | 382275, |
| 2-Heptanona - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,3121E6 | 382275, |
| 2-Heptanona - 3-metil-1-butanol | | 239060, | 382275, |
| 2-Heptanona - Acetato de 2-fenil etilo | * | -614479, | 382275, |
| 2-Heptanona - Acetato de 2-metil-butanol | | 188205, | 382275, |
| 2-Heptanona - Acetato de isoamil | * | -697409, | 382275, |
| 2-Heptanona - Acetato de sec- butilo | * | -463960, | 382275, |
| 2-Heptanona - Acetofenona | | 248336, | 382275, |
| 2-Heptanona - Acido acetico | * | -1,97567E7 | 382275, |
| 2-Heptanona - Alfa.TERPINOLENO | * | -459061, | 382275, |
| 2-Heptanona - Bencen acetaldehido | | 228485, | 382275, |
| 2-Heptanona - Bencen etanol | * | -398795, | 382275, |
| 2-Heptanona - Benzaldehido | * | -1,46158E6 | 382275, |
| 2-Heptanona - Beta-MYRCENO | | 117210, | 382275, |
| 2-Heptanona - Beta-OCIMENO | | 169584, | 382275, |
| 2-Heptanona - Caprilato de etilo | | 145340, | 382275, |
| 2-Heptanona - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | 46553,5 | 382275, |
| 2-Heptanona - Fenil acetato de etilo | | -43799,0 | 382275, |
| 2-Heptanona - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 187754, | 382275, |
| 2-Heptanona - Tetrametil pirazina | * | -5,31544E6 | 382275, |
| 2-Heptanona - Trimetil pirazina | | -196792, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - 2-fenil-2-butenal | | -37963,0 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - 2-metil butanal | | 38084,5 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - 2-nonanona | | -372389, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,51889E6 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - 3-metil-1-butanol | | 32278,0 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Acetato de 2-fenil etilo | * | -821261, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Acetato de 2-metil-butanol | | -18576,5 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Acetato de isoamil | * | -904190, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Acetato de sec- butilo | * | -670742, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Acetofenona | | 41554,0 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Acido acetico | * | -1,99635E7 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Alfa.TERPINOLENO | * | -665843, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Bencen acetaldehido | | 21703,5 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Bencen etanol | * | -605576, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Benzaldehido | * | -1,66836E6 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Beta-MYRCENO | | -89572,0 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Beta-OCIMENO | | -37197,5 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Caprilato de etilo | | -61441,5 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -160228, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Fenil acetato de etilo | | -250581, | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | -19027,5 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Tetrametil pirazina | * | -5,52222E6 | 382275, |
| 2-acetil-pirrol - Trimetil pirazina | * | -403573, | 382275, |

| | | | |
|---|---|------------|---------|
| 2-fenil-2-butenal - 2-metil butanal | | 76047,5 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - 2-nonanona | | -334426, | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,48092E6 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - 3-metil-1-butanol | | 70241,0 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Acetato de 2-fenil etilo | * | -783298, | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Acetato de 2-metil-butanol | | 19386,5 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Acetato de isoamil | * | -866227, | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Acetato de sec- butilo | * | -632779, | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Acetofenona | | 79517,0 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Acido acetico | * | -1,99255E7 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Alfa.TERPINOLENO | * | -627880, | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Bencen acetaldehido | | 59666,5 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Bencen etanol | * | -567613, | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Benzaldehido | * | -1,6304E6 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Beta-MYRCENO | | -51609,0 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Beta-OCIMENO | | 765,5 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Caprilato de etilo | | -23478,5 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -122265, | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Fenil acetato de etilo | | -212618, | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 18935,5 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Tetrametil pirazina | * | -5,48426E6 | 382275, |
| 2-fenil-2-butenal - Trimetil pirazina | | -365610, | 382275, |
| 2-metil butanal - 2-nonanona | * | -410474, | 382275, |
| 2-metil butanal - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,55697E6 | 382275, |
| 2-metil butanal - 3-metil-1-butanol | | -5806,5 | 382275, |
| 2-metil butanal - Acetato de 2-fenil etilo | * | -859345, | 382275, |
| 2-metil butanal - Acetato de 2-metil-butanol | | -56661,0 | 382275, |
| 2-metil butanal - Acetato de isoamil | * | -942275, | 382275, |
| 2-metil butanal - Acetato de sec- butilo | * | -708826, | 382275, |
| 2-metil butanal - Acetofenona | | 3469,5 | 382275, |
| 2-metil butanal - Acido acetico | * | -2,00016E7 | 382275, |
| 2-metil butanal - Alfa.TERPINOLENO | * | -703927, | 382275, |
| 2-metil butanal - Bencen acetaldehido | | -16381,0 | 382275, |
| 2-metil butanal - Bencen etanol | * | -643661, | 382275, |
| 2-metil butanal - Benzaldehido | * | -1,70645E6 | 382275, |
| 2-metil butanal - Beta-MYRCENO | | -127657, | 382275, |
| 2-metil butanal - Beta-OCIMENO | | -75282,0 | 382275, |
| 2-metil butanal - Caprilato de etilo | | -99526,0 | 382275, |
| 2-metil butanal - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -198313, | 382275, |
| 2-metil butanal - Fenil acetato de etilo | | -288665, | 382275, |
| 2-metil butanal - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | -57112,0 | 382275, |
| 2-metil butanal - Tetrametil pirazina | * | -5,56031E6 | 382275, |
| 2-metil butanal - Trimetil pirazina | * | -441658, | 382275, |
| 2-nonanona - 3-hidroxi-2-butanona | * | -1,1465E6 | 382275, |
| 2-nonanona - 3-metil-1-butanol | * | 404667, | 382275, |
| 2-nonanona - Acetato de 2-fenil etilo | * | -448872, | 382275, |
| 2-nonanona - Acetato de 2-metil-butanol | | 353813, | 382275, |
| 2-nonanona - Acetato de isoamil | * | -531801, | 382275, |
| 2-nonanona - Acetato de sec- butilo | | -298353, | 382275, |
| 2-nonanona - Acetofenona | * | 413943, | 382275, |
| 2-nonanona - Acido acetico | * | -1,95911E7 | 382275, |
| 2-nonanona - Alfa.TERPINOLENO | | -293454, | 382275, |
| 2-nonanona - Bencen acetaldehido | * | 394093, | 382275, |
| 2-nonanona - Bencen etanol | | -233187, | 382275, |

| | | | |
|--|---|------------|---------|
| 2-nonanona - Benzaldehido | * | -1,29598E6 | 382275, |
| 2-nonanona - Beta-MYRCENO | | 282817, | 382275, |
| 2-nonanona - Beta-OCIMENO | | 335192, | 382275, |
| 2-nonanona - Caprilato de etilo | | 310948, | 382275, |
| 2-nonanona - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | 212161, | 382275, |
| 2-nonanona - Fenil acetato de etilo | | 121809, | 382275, |
| 2-nonanona - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 353362, | 382275, |
| 2-nonanona - Tetrametil pirazina | * | -5,14983E6 | 382275, |
| 2-nonanona - Trimetil pirazina | | -31184,0 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - 3-metil-1-butanol | * | 1,55116E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Acetato de 2-fenil etilo | * | 697626, | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Acetato de 2-metil-butanol | * | 1,50031E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Acetato de isoamil | * | 614696, | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Acetato de sec- butilo | * | 848145, | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Acetofenona | * | 1,56044E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Acido acetico | * | -1,84446E7 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Alfa.TERPINOLENO | * | 853044, | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Bencen acetaldehido | * | 1,54059E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Bencen etanol | * | 913310, | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Benzaldehido | | -149478, | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Beta-MYRCENO | * | 1,42931E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Beta-OCIMENO | * | 1,48169E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Caprilato de etilo | * | 1,45744E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 1,35866E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Fenil acetato de etilo | * | 1,26831E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 1,49986E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Tetrametil pirazina | * | -4,00334E6 | 382275, |
| 3-hidroxi-2-butanona - Trimetil pirazina | * | 1,11531E6 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Acetato de 2-fenil etilo | * | -853539, | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Acetato de 2-metil-butanol | | -50854,5 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Acetato de isoamil | * | -936468, | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Acetato de sec- butilo | * | -703020, | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Acetofenona | | 9276,0 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Acido acetico | * | -1,99958E7 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Alfa.TERPINOLENO | * | -698121, | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Bencen acetaldehido | | -10574,5 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Bencen etanol | * | -637854, | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Benzaldehido | * | -1,70064E6 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Beta-MYRCENO | | -121850, | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Beta-OCIMENO | | -69475,5 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Caprilato de etilo | | -93719,5 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -192506, | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Fenil acetato de etilo | | -282859, | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | -51305,5 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Tetrametil pirazina | * | -5,5545E6 | 382275, |
| 3-metil-1-butanol - Trimetil pirazina | * | -435851, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Acetato de 2-metil-butanol | * | 802684, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Acetato de isoamil | | -82929,5 | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Acetato de sec- butilo | | 150519, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Acetofenona | * | 862815, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Acido acetico | * | -1,91422E7 | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Alfa.TERPINOLENO | | 155418, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Bencen acetaldehido | * | 842964, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Bencen etanol | | 215685, | 382275, |

| | | | |
|--|---|------------|---------|
| Acetato de 2-fenil etilo - Benzaldehido | * | -847104, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Beta-MYRCENO | * | 731689, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Beta-OCIMENO | * | 784063, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Caprilato de etilo | * | 759819, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 661033, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Fenil acetato de etilo | * | 570680, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 802233, | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Tetrametil pirazina | * | -4,70096E6 | 382275, |
| Acetato de 2-fenil etilo - Trimetil pirazina | * | 417688, | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Acetato de isoamil | * | -885614, | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Acetato de sec- butilo | * | -652165, | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Acetofenona | | 60130,5 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Acido acetico | * | -1,99449E7 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Alfa.TERPINOLENO | * | -647266, | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Bencen acetaldehido | | 40280,0 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Bencen etanol | * | -587000, | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Benzaldehido | * | -1,64979E6 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Beta-MYRCENO | | -70995,5 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Beta-OCIMENO | | -18621,0 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Caprilato de etilo | | -42865,0 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -141652, | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Fenil acetato de etilo | | -232004, | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | -451,0 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Tetrametil pirazina | * | -5,50365E6 | 382275, |
| Acetato de 2-metil-butanol - Trimetil pirazina | * | -384997, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Acetato de sec- butilo | | 233449, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Acetofenona | * | 945744, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Acido acetico | * | -1,90593E7 | 382275, |
| Acetato de isoamil - Alfa.TERPINOLENO | | 238348, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Bencen acetaldehido | * | 925894, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Bencen etanol | | 298614, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Benzaldehido | * | -764174, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Beta-MYRCENO | * | 814618, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Beta-OCIMENO | * | 866993, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Caprilato de etilo | * | 842749, | 382275, |
| Acetato de isoamil - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 743962, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Fenil acetato de etilo | * | 653610, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 885163, | 382275, |
| Acetato de isoamil - Tetrametil pirazina | * | -4,61803E6 | 382275, |
| Acetato de isoamil - Trimetil pirazina | * | 500617, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Acetofenona | * | 712296, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Acido acetico | * | -1,92927E7 | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Alfa.TERPINOLENO | | 4899,0 | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Bencen acetaldehido | * | 692445, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Bencen etanol | | 65165,5 | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Benzaldehido | * | -997623, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Beta-MYRCENO | * | 581170, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Beta-OCIMENO | * | 633544, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Caprilato de etilo | * | 609300, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 510514, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Fenil acetato de etilo | * | 420161, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 651714, | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Tetrametil pirazina | * | -4,85148E6 | 382275, |
| Acetato de sec- butilo - Trimetil pirazina | | 267169, | 382275, |

| | | | |
|---|---|------------|---------|
| Acetofenona - Acido acetico | * | -2,0005E7 | 382275, |
| Acetofenona - Alfa.TERPINOLENO | * | -707397, | 382275, |
| Acetofenona - Bencen acetaldehido | | -19850,5 | 382275, |
| Acetofenona - Bencen etanol | * | -647130, | 382275, |
| Acetofenona - Benzaldehido | * | -1,70992E6 | 382275, |
| Acetofenona - Beta-MYRCENO | | -131126, | 382275, |
| Acetofenona - Beta-OCIMENO | | -78751,5 | 382275, |
| Acetofenona - Caprilato de etilo | | -102996, | 382275, |
| Acetofenona - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -201782, | 382275, |
| Acetofenona - Fenil acetato de etilo | | -292135, | 382275, |
| Acetofenona - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | -60581,5 | 382275, |
| Acetofenona - Tetrametil pirazina | * | -5,56378E6 | 382275, |
| Acetofenona - Trimetil pirazina | * | -445127, | 382275, |
| Acido acetico - Alfa.TERPINOLENO | * | 1,92976E7 | 382275, |
| Acido acetico - Bencen acetaldehido | * | 1,99852E7 | 382275, |
| Acido acetico - Bencen etanol | * | 1,93579E7 | 382275, |
| Acido acetico - Benzaldehido | * | 1,82951E7 | 382275, |
| Acido acetico - Beta-MYRCENO | * | 1,98739E7 | 382275, |
| Acido acetico - Beta-OCIMENO | * | 1,99263E7 | 382275, |
| Acido acetico - Caprilato de etilo | * | 1,9902E7 | 382275, |
| Acido acetico - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 1,98033E7 | 382275, |
| Acido acetico - Fenil acetato de etilo | * | 1,97129E7 | 382275, |
| Acido acetico - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 1,99445E7 | 382275, |
| Acido acetico - Tetrametil pirazina | * | 1,44413E7 | 382275, |
| Acido acetico - Trimetil pirazina | * | 1,95599E7 | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Bencen acetaldehido | * | 687546, | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Bencen etanol | | 60266,5 | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Benzaldehido | * | -1,00252E6 | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Beta-MYRCENO | * | 576271, | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Beta-OCIMENO | * | 628645, | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Caprilato de etilo | * | 604401, | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 505615, | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Fenil acetato de etilo | * | 415262, | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 646815, | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Tetrametil pirazina | * | -4,85638E6 | 382275, |
| Alfa.TERPINOLENO - Trimetil pirazina | | 262270, | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Bencen etanol | * | -627280, | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Benzaldehido | * | -1,69007E6 | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Beta-MYRCENO | | -111276, | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Beta-OCIMENO | | -58901,0 | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Caprilato de etilo | | -83145,0 | 382275, |
| Bencen acetaldehido - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -181932, | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Fenil acetato de etilo | | -272284, | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | -40731,0 | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Tetrametil pirazina | * | -5,54393E6 | 382275, |
| Bencen acetaldehido - Trimetil pirazina | * | -425277, | 382275, |
| Bencen etanol - Benzaldehido | * | -1,06279E6 | 382275, |
| Bencen etanol - Beta-MYRCENO | * | 516004, | 382275, |
| Bencen etanol - Beta-OCIMENO | * | 568379, | 382275, |
| Bencen etanol - Caprilato de etilo | * | 544135, | 382275, |
| Bencen etanol - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 445348, | 382275, |
| Bencen etanol - Fenil acetato de etilo | | 354996, | 382275, |
| Bencen etanol - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 586549, | 382275, |
| Bencen etanol - Tetrametil pirazina | * | -4,91665E6 | 382275, |

| | | | |
|--|---|------------|---------|
| Bencen etanol - Trimetil pirazina | | 202003, | 382275, |
| Benzaldehido - Beta-MYRCENO | * | 1,57879E6 | 382275, |
| Benzaldehido - Beta-OCIMENO | * | 1,63117E6 | 382275, |
| Benzaldehido - Caprilato de etilo | * | 1,60692E6 | 382275, |
| Benzaldehido - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | * | 1,50814E6 | 382275, |
| Benzaldehido - Fenil acetato de etilo | * | 1,41778E6 | 382275, |
| Benzaldehido - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | * | 1,64934E6 | 382275, |
| Benzaldehido - Tetrametil pirazina | * | -3,85386E6 | 382275, |
| Benzaldehido - Trimetil pirazina | * | 1,26479E6 | 382275, |
| Beta-MYRCENO - Beta-OCIMENO | | 52374,5 | 382275, |
| Beta-MYRCENO - Caprilato de etilo | | 28130,5 | 382275, |
| Beta-MYRCENO - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -70656,0 | 382275, |
| Beta-MYRCENO - Fenil acetato de etilo | | -161009, | 382275, |
| Beta-MYRCENO - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 70544,5 | 382275, |
| Beta-MYRCENO - Tetrametil pirazina | * | -5,43265E6 | 382275, |
| Beta-MYRCENO - Trimetil pirazina | | -314001, | 382275, |
| Beta-OCIMENO - Caprilato de etilo | | -24244,0 | 382275, |
| Beta-OCIMENO - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -123031, | 382275, |
| Beta-OCIMENO - Fenil acetato de etilo | | -213383, | 382275, |
| Beta-OCIMENO - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 18170,0 | 382275, |
| Beta-OCIMENO - Tetrametil pirazina | * | -5,48502E6 | 382275, |
| Beta-OCIMENO - Trimetil pirazina | | -366376, | 382275, |
| Caprilato de etilo - D,l-diacetato de 2,3-butandiol | | -98786,5 | 382275, |
| Caprilato de etilo - Fenil acetato de etilo | | -189139, | 382275, |
| Caprilato de etilo - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 42414,0 | 382275, |
| Caprilato de etilo - Tetrametil pirazina | * | -5,46078E6 | 382275, |
| Caprilato de etilo - Trimetil pirazina | | -342132, | 382275, |
| D,l-diacetato de 2,3-butandiol - Fenil acetato de etilo | | -90352,5 | 382275, |
| D,l-diacetato de 2,3-butandiol - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 141201, | 382275, |
| D,l-diacetato de 2,3-butandiol - Tetrametil pirazina | * | -5,36199E6 | 382275, |
| D,l-diacetato de 2,3-butandiol - Trimetil pirazina | | -243345, | 382275, |
| Fenil acetato de etilo - Meso-diacetato de 2,3-butandiol | | 231553, | 382275, |
| Fenil acetato de etilo - Tetrametil pirazina | * | -5,27164E6 | 382275, |
| Fenil acetato de etilo - Trimetil pirazina | | -152993, | 382275, |
| Meso-diacetato de 2,3-butandiol - Tetrametil pirazina | * | -5,50319E6 | 382275, |
| Meso-diacetato de 2,3-butandiol - Trimetil pirazina | * | -384546, | 382275, |
| Tetrametil pirazina - Trimetil pirazina | * | 5,11865E6 | 382275, |

* indica una diferencia significativa.

ANEXO H. Diferencias estimadas entre cada par de medias para los 16 compuestos comunes y mayoritarios en las tres muestras de cacao

| Contraste | Sig. | Diferencia |
|---|------|------------|
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - 2,3-BUTANEDIOL | | -297121, |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - 2,3-DIMETIL-PIRAZINA | | -239058, |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - 2-FENIL-2-BUTENAL | | 21081,7 |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - 2-HEPTANOL | | -338183, |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - 2-NONANONA | | -247557, |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - 3-HIDROXI-2-BUTANONA | | -1,10185E6 |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - ACETATO DE SEC- BUTILO | | -377640, |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - ACETOFENONA | | -98206,7 |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - ACIDO ACETICO | * | -1,77785E7 |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - BENCEN ETANOL | | -527405, |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - BENZALDEHIDO | | -1,13545E6 |

| | | |
|---|---|------------|
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - CAPRILATO DE ETILO | | -40740,3 |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - FENIL ACETATO DE ETILO | | -115486, |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,83493E6 |
| 2,3,5-TRIMETIL-6-ETIL-PIRAZINA - TRIMETIL PIRAZINA | | -463517, |
| 2,3-BUTANEDIOL - 2,3-DIMETIL-PIRAZINA | | 58063,3 |
| 2,3-BUTANEDIOL - 2-FENIL-2-BUTENAL | | 318203, |
| 2,3-BUTANEDIOL - 2-HEPTANOL | | -41062,0 |
| 2,3-BUTANEDIOL - 2-NONANONA | | 49563,7 |
| 2,3-BUTANEDIOL - 3-HIDROXI-2-BUTANONA | | -804727, |
| 2,3-BUTANEDIOL - ACETATO DE SEC- BUTILO | | -80518,7 |
| 2,3-BUTANEDIOL - ACETOFENONA | | 198914, |
| 2,3-BUTANEDIOL - ACIDO ACETICO | * | -1,74814E7 |
| 2,3-BUTANEDIOL - BENCEN ETANOL | | -230284, |
| 2,3-BUTANEDIOL - BENZALDEHIDO | | -838332, |
| 2,3-BUTANEDIOL - CAPRILATO DE ETILO | | 256381, |
| 2,3-BUTANEDIOL - FENIL ACETATO DE ETILO | | 181635, |
| 2,3-BUTANEDIOL - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,53781E6 |
| 2,3-BUTANEDIOL - TRIMETIL PIRAZINA | | -166396, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - 2-FENIL-2-BUTENAL | | 260139, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - 2-HEPTANOL | | -99125,3 |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - 2-NONANONA | | -8499,67 |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - 3-HIDROXI-2-BUTANONA | | -862791, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - ACETATO DE SEC- BUTILO | | -138582, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - ACETOFENONA | | 140851, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - ACIDO ACETICO | * | -1,75395E7 |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - BENCEN ETANOL | | -288348, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - BENZALDEHIDO | | -896395, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - CAPRILATO DE ETILO | | 198317, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - FENIL ACETATO DE ETILO | | 123572, |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,59588E6 |
| 2,3-DIMETIL-PIRAZINA - TRIMETIL PIRAZINA | | -224459, |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - 2-HEPTANOL | | -359265, |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - 2-NONANONA | | -268639, |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - 3-HIDROXI-2-BUTANONA | | -1,12293E6 |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - ACETATO DE SEC- BUTILO | | -398721, |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - ACETOFENONA | | -119288, |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - ACIDO ACETICO | * | -1,77996E7 |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - BENCEN ETANOL | | -548487, |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - BENZALDEHIDO | | -1,15653E6 |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - CAPRILATO DE ETILO | | -61822,0 |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - FENIL ACETATO DE ETILO | | -136567, |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,85602E6 |
| 2-FENIL-2-BUTENAL - TRIMETIL PIRAZINA | | -484599, |
| 2-HEPTANOL - 2-NONANONA | | 90625,7 |
| 2-HEPTANOL - 3-HIDROXI-2-BUTANONA | | -763665, |
| 2-HEPTANOL - ACETATO DE SEC- BUTILO | | -39456,7 |
| 2-HEPTANOL - ACETOFENONA | | 239976, |
| 2-HEPTANOL - ACIDO ACETICO | * | -1,74403E7 |
| 2-HEPTANOL - BENCEN ETANOL | | -189222, |
| 2-HEPTANOL - BENZALDEHIDO | | -797270, |
| 2-HEPTANOL - CAPRILATO DE ETILO | | 297443, |
| 2-HEPTANOL - FENIL ACETATO DE ETILO | | 222697, |
| 2-HEPTANOL - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,49675E6 |
| 2-HEPTANOL - TRIMETIL PIRAZINA | | -125334, |

| | | |
|---|---|------------|
| 2-NONANONA - 3-HIDROXI-2-BUTANONA | | -854291, |
| 2-NONANONA - ACETATO DE SEC- BUTILO | | -130082, |
| 2-NONANONA - ACETOFENONA | | 149351, |
| 2-NONANONA - ACIDO ACETICO | * | -1,7531E7 |
| 2-NONANONA - BENCEN ETANOL | | -279848, |
| 2-NONANONA - BENZALDEHIDO | | -887895, |
| 2-NONANONA - CAPRILATO DE ETILO | | 206817, |
| 2-NONANONA - FENIL ACETATO DE ETILO | | 132072, |
| 2-NONANONA - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,58738E6 |
| 2-NONANONA - TRIMETIL PIRAZINA | | -215960, |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - ACETATO DE SEC- BUTILO | | 724209, |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - ACETOFENONA | | 1,00364E6 |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - ACIDO ACETICO | * | -1,66767E7 |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - BENCEN ETANOL | | 574443, |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - BENZALDEHIDO | | -33604,3 |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - CAPRILATO DE ETILO | | 1,06111E6 |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - FENIL ACETATO DE ETILO | | 986363, |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -2,73309E6 |
| 3-HIDROXI-2-BUTANONA - TRIMETIL PIRAZINA | | 638331, |
| ACETATO DE SEC- BUTILO - ACETOFENONA | | 279433, |
| ACETATO DE SEC- BUTILO - ACIDO ACETICO | * | -1,74009E7 |
| ACETATO DE SEC- BUTILO - BENCEN ETANOL | | -149766, |
| ACETATO DE SEC- BUTILO - BENZALDEHIDO | | -757813, |
| ACETATO DE SEC- BUTILO - CAPRILATO DE ETILO | | 336899, |
| ACETATO DE SEC- BUTILO - FENIL ACETATO DE ETILO | | 262154, |
| ACETATO DE SEC- BUTILO - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,45729E6 |
| ACETATO DE SEC- BUTILO - TRIMETIL PIRAZINA | | -85877,3 |
| ACETOFENONA - ACIDO ACETICO | * | -1,76803E7 |
| ACETOFENONA - BENCEN ETANOL | | -429199, |
| ACETOFENONA - BENZALDEHIDO | | -1,03725E6 |
| ACETOFENONA - CAPRILATO DE ETILO | | 57466,3 |
| ACETOFENONA - FENIL ACETATO DE ETILO | | -17279,0 |
| ACETOFENONA - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,73673E6 |
| ACETOFENONA - TRIMETIL PIRAZINA | | -365310, |
| ACIDO ACETICO - BENCEN ETANOL | * | 1,72511E7 |
| ACIDO ACETICO - BENZALDEHIDO | * | 1,66431E7 |
| ACIDO ACETICO - CAPRILATO DE ETILO | * | 1,77378E7 |
| ACIDO ACETICO - FENIL ACETATO DE ETILO | * | 1,7663E7 |
| ACIDO ACETICO - TETRAMETIL PIRAZINA | * | 1,39436E7 |
| ACIDO ACETICO - TRIMETIL PIRAZINA | * | 1,7315E7 |
| BENCEN ETANOL - BENZALDEHIDO | | -608047, |
| BENCEN ETANOL - CAPRILATO DE ETILO | | 486665, |
| BENCEN ETANOL - FENIL ACETATO DE ETILO | | 411920, |
| BENCEN ETANOL - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,30753E6 |
| BENCEN ETANOL - TRIMETIL PIRAZINA | | 63888,3 |
| BENZALDEHIDO - CAPRILATO DE ETILO | | 1,09471E6 |
| BENZALDEHIDO - FENIL ACETATO DE ETILO | | 1,01997E6 |
| BENZALDEHIDO - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -2,69948E6 |
| BENZALDEHIDO - TRIMETIL PIRAZINA | | 671936, |
| CAPRILATO DE ETILO - FENIL ACETATO DE ETILO | | -74745,3 |
| CAPRILATO DE ETILO - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,79419E6 |
| CAPRILATO DE ETILO - TRIMETIL PIRAZINA | | -422777, |
| FENIL ACETATO DE ETILO - TETRAMETIL PIRAZINA | * | -3,71945E6 |
| FENIL ACETATO DE ETILO - TRIMETIL PIRAZINA | | -348031, |

| | | |
|---|---|-----------|
| TETRAMETIL PIRAZINA - TRIMETIL PIRAZINA | * | 3,37142E6 |
|---|---|-----------|